

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Microencapsulação de Óleos Essenciais

Tese de Mestrado

de

Ana Catarina Godinho Moreira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Orientador na FEUP: **Dra. Isabel Martins**

Co-orientador na FEUP: **Prof. Alírio Rodrigues**



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Departamento de Engenharia Química

Julho de 2014

Agradecimentos

“Mais importante que a vontade de vencer, é a coragem de começar.”

Comecei este percurso em 2009, depois de ponderar bastante a minha entrada na FEUP. Perto do fim deste percurso, vi portas a fecharem-se aquando das colocações para o desenvolvimento da dissertação. Agora, que estou perto do fim deste ciclo, compreendo o porquê de se dizer que “Deus escreve direito por linhas tortas”. Tinha de ser assim e agora não mudaria nada. Por isso:

Um Grande Obrigada à minha orientadora Doutora Isabel Martins, pelo apoio constante, total dedicação e compreensão nestes cinco meses de trabalho. Sei que sozinha, tudo seria mais difícil. Agradeço também ao meu co-orientador Professor Alírio Rodrigues a oportunidade de poder elaborar a minha dissertação no LSRE. Quero agradecer à Professora Filomena Barreiro e à Investigadora Isabel Fernandes pela disponibilidade que tiveram para a realização dos testes antimicrobianos, no Instituto Politécnico de Bragança.

Agradeço à minha amiga de infância, Carol, que apesar da “distância” sei que tudo permanece igual. À minha amiga Bárbara pela paciência, amizade, apoio constante e bons momentos. Tenho a certeza que será assim para sempre.

Quero agradecer aos meus amigos que me acompanharam e me aturaram ao longo destes cinco anos de faculdade: ao meu “parceiro” de laboratório e de ramo Farturas, à inseparável Uníssumo, à minha gémea Pauliteira, à sempre bem-disposta PHK, e à pessoa que talvez mais me ouviu nestes últimos meses, à CRM7. Apesar das relações de amizade se terem formado mais tarde, agradeço também ao Sabugo, à Patapi, ao Cobilhas, à Pepsodent, ao Punhas, à Pisco, à Inês, à Ventura, ao Diácono, ao Bexigas, ao Caleiras, à Catarina e à Maria João. Obrigada a TODOS pelos ótimos momentos que passamos e partilhamos. Espero, sinceramente, continuar a partilhá-los daqui em diante.

Obrigada à minha amiga e ‘maninha engenhoenfermeira’ Reviras, que apesar de não conseguir estar tão presente no meu quotidiano, sempre me apoiou, aturou e se preocupou em voltar à sua FEUP, nem que fosse para um simples ‘olá’. Agradeço ao Beijas pelas palavras certas nas horas certas e pela coragem que sempre me incentivou a ter. E também à Pocahontas, à Samara, ao Daniel San e à Rita Rosa por todo o carinho demonstrado. Todos vocês fizeram parte da minha vida académica e farão parte da minha vida futura certamente.

Quero agradecer também à minha família: à minha avó Glória e em especial aos meus avós, Cila e Ciso que estiveram sempre presentes na minha vida e que contribuíram muito para o que sou hoje.

Finalmente, um GRANDE OBRIGADA aos verdadeiros amores da minha vida: a minha Mãe Mira e o meu Pai Toninho. Obrigada pelo amor, carinho, atenção, incentivo e por tudo o que me proporcionaram até hoje. Espero que daqui para a frente consiga também proporcionar-vos muitas alegrias.

Obrigada a todos,
Catarina

Resumo

O objetivo deste trabalho consiste na produção de microcápsulas de Óleo de Tomilho revestidas com um polímero biodegradável, PLGA, através de um método recente de coacervação, já testado. O uso de um polímero biodegradável deve-se à sua fácil biodegradação e biocompatibilidade, possibilitando assim a libertação do princípio ativo. Já o princípio ativo, o Óleo de Tomilho é caracterizado pela excelente capacidade antimicrobiana que possuiu, devido à alguns dos seus constituintes, nomeadamente Timol e Carvacrol.

A viabilidade das microcápsulas produzidas com dois tipos de Óleo de Tomilho foi avaliada através da microscopia ótica, análise do tamanho de partículas e cromatografia gasosa permitindo assim analisar, respetivamente, a morfologia das microcápsulas, o diâmetro interno das partícula e a espessura da membrana, e calcular a eficiência de encapsulação do princípio ativo.

A capacidade antimicrobiana do Óleo de Tomilho foi testada, de forma a averiguar a possibilidade de uma futura incorporação das microcápsulas produzidas em cosméticos.

Palavras-Chave: Microencapsulação, coacervação, óleos essenciais, ácido Poli (lático-co-glicólico), eficiências de encapsulação, testes antimicrobianos

Abstract

The main goal of this work is a production of Thyme Oil microcapsules coated by a biodegradable polymer, PLGA, through a recent coacervation process, already tested. A biodegradable polymer was used due to its easy biodegradation and biocompatibility, allowing the release of active principle. The active principle, Thyme Oil, is characterized by excellent antimicrobial activity due to some of its components, namely Thymol and Carvacrol.

The viability of produced microcapsules with two types of Thyme Oil was evaluated through optic microscopy, particle size analysis and gas chromatography. These methods allowed to analyze the microcapsules morphology, the diameter of the particles and thickness of membrane, and calculation of encapsulation efficiency of active principle.

The Thyme Oil antimicrobial activity was tested too, in order to verify the possibility of a future incorporation of the produced microcapsules in cosmetics.

Keywords: Microencapsulation, coacervation, essential oils, poly(lactic co-glycolic) acid, encapsulation efficiencies, antimicrobial tests

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Índice

1 Introdução	1
1.1 RELEVÂNCIA E MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE	2
1.3 CONTRIBUTOS DO TRABALHO	3
2 Contexto e Estado da Arte	5
2.1 MICROCÁPSULAS	5
2.1.1 Definição	5
2.1.2 Morfologia	5
2.1.3 <i>Background</i> histórico	6
2.1.4 Benefícios da Microencapsulação	7
2.1.5 Materiais de Encapsulação (Polímeros Biodegradáveis)	8
2.1.6 Princípios Ativos: óleos essenciais	10
2.2 TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO	14
2.2.1 Técnicas Químicas	14
2.2.2 Técnicas Físico-Mecânicas	15
2.2.3 Técnicas Físico-Químicas	16
2.3 MECANISMOS DE LIBERTAÇÃO	18
2.4 APLICAÇÕES DAS MICROCÁPSULAS	19
3 Descrição Técnica	21
3.1 REAGENTES E MÉTODOS	21
3.1.1 Reagentes	21
3.1.2 Método Experimental	21
3.1.3 Estudos da eficiência de encapsulação: Técnicas de caracterização	23
3.1.4 Estudos da capacidade antimicrobiana: procedimento	25
3.2 RESULTADOS	26
3.2.1 Estudos de eficiência de encapsulação	26
3.2.2 Estudo da capacidade antimicrobiana	35
4 Conclusões	39

4.1	OBJETIVOS REALIZADOS	39
4.2	LIMITAÇÕES E TRABALHO FUTURO.....	40
4.3	APRECIÇÃO FINAL	40
	Referências	41
	Anexo 1 Retas de Calibração	47

Lista de Figuras:

Figura 1: Distribuição das publicações sobre microencapsulação por continentes desde 1960 até ao presente, segundo a base de dados Scopus (Scopus, 2014).	1
Figura 2: Composição de microcápsulas.	5
Figura 3: Morfologias das microcápsulas: (a) mononuclear, (b) polinuclear, (c) matriz.	6
Figura 4: Papel de cópia sem carbono (Hiwtc, 2014).	6
Figura 5: Número de artigos publicados nos últimos vinte anos, retirado da base de dados Scopus, palavras-chave “microencapsulation” + tipo de documento “article” + ano (Scopus, 2014).	7
Figura 6: (a) ácido Polilático (PLA); (b) ácido Poliglicólico (PGA); (c) ácido Poli (lático-co-glicólico) (PLGA) onde x refere-se ao ácido lático e y ao ácido glicólico.	9
Figura 7: (a) A planta de Tomilho (Utad, 2014); (b) folhas de Tomilho seco usadas como especiarias.	12
Figura 8: Fórmulas químicas dos compostos principais do Óleo de Tomilho.	12
Figura 9: Número de artigos publicados desde 1960 até ao presente, retirado da base de dados Scopus, palavras-chave “microencapsulation”, “coacervation” e “application” (Scopus, 2014).	17
Figura 10: Representação esquemática do procedimento experimental utilizado.	22
Figura 11: Cilas 1090 Particle Size Analyzer (Cilas, 2014).	24
Figura 12: Microscópio ótico Leica DM 2000 (Bio Optic, 2014).	24
Figura 13: Equipamento de Cromatografia Gasosa (GC-FID).	25
Figura 14: Distribuição do tamanho das microcápsulas de PLGA: (a) com Óleo de Tomilho Vermelho, (b) com Óleo de Tomilho Branco.	27
Figura 15: Imagens obtidas por microscopia ótica da solução da fase de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho, com a resolução de 200×: (a) “Brigth Field”, (b) “Dark Field”.	29
Figura 16: Imagens obtidas por microscopia ótica da solução da fase de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco, com a resolução de 200×: (a) “Brigth Field”, (b) “Dark Field”.	29
Figura 17: Espectros de massa do óleo essencial: (a) Tomilho Vermelho, (b) Tomilho Branco.	30
Figura 18: Cromatogramas obtidos referentes à fase aquosa (a) e fase de microcápsulas (b).	32
Figura 19: Placas de Petri após inoculação e introdução das amostras RED2 e WHITE2 respetivamente.	35

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Princípios ativos usados em microencapsulação e respectivas aplicações.....	11
Tabela 2: Óleos essenciais usados na microencapsulação e respectivas aplicações.	11
Tabela 3: Tamanho da partícula produzida segundo o método utilizado.	14
Tabela 4: Exemplos de patentes existentes sobre microencapsulação em cosméticos.....	20
Tabela 5: Descrição dos reagentes usados no processo de produção de microcápsulas	21
Tabela 6: Quantificação dos componentes do Óleo de Tomilho e os seus tempos de retenção.....	31
Tabela 7: Eficiências de encapsulação do Óleo de Tomilho Vermelho nas microcápsulas de PLGA.....	33
Tabela 8: Eficiências de encapsulação do Óleo de Tomilho Branco nas microcápsulas de PLGA.	33
Tabela 9: Diâmetro do halo de inibição após 24 horas e 4 dias para as amostras e respectivos duplicados.	35
Tabela 10: Diâmetro do halo de inibição após 24 horas e 4 dias para as amostras e respectivos duplicados.	36

Notação e Glossário

T_g	Temperatura de transição vítrea	°C
d_s	Espessura da membrana das microcápsulas	μm
r_m	Raio exterior da partícula	μm
r_c	Raio interno da partícula	μm
w_s	Massa do material de parede	g
w_c	Massa do princípio ativo	g
t_r	Tempo de retenção	min
m	Massa	g
D_{hi}	Diâmetro do halo de inibição	cm

Índices

i	Componente
---	------------

Lista de Siglas

ATP	Adenosina Trifosfato
DMF	Dimetilformamida
GC-FID	Gas Chromatography – <i>Flame Ionization Detector</i>
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
OCTMS	Octametilciclotetrasiloxano
PCM	<i>Phase Change Materials</i>
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido polilático
PLGA	Ácido poli (lático-co-glicólico)
RED1	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho sem lavagens
RED2	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho sem lavagens - duplicado
RED-L1	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho com lavagens
RED-L2	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho com lavagens - duplicado
WHITE1	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco sem lavagens
WHITE2	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco sem lavagens - duplicado
WHITE-L1	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco com lavagens
WHITE-L2	Ensaio de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco com lavagens - duplicado

1 Introdução

1.1 RELEVÂNCIA E MOTIVAÇÃO

A microencapsulação é uma técnica que tem vindo a ganhar forma ao longo dos tempos. Prova disso é a crescente informação disponível em bases de dados científicas. Entre artigos, livros ou *reviews* contabilizam-se, só na base de dados Scopus, cerca de 7800 ‘publicações’ desde os anos 60. Os estudos desenvolvidos sobre microencapsulação surgem um pouco por todo o mundo, no entanto é possível observar na Figura 1 que os desenvolvimentos desta técnica são mais elevados na Ásia, com 35% do total de informação existente sobre esta temática, seguindo-se a Europa com 33%, uma vez que países como China, Índia, Japão ou França, Alemanha e Espanha são os maiores contribuintes para estes valores (Scopus, 2014).

Com base no Scopus e contabilizando apenas os países europeus sabe-se que Portugal é o oitavo país com cerca de 100 publicações, sendo que a França lidera com pouco mais de 350 publicações. Apesar da contínua investigação em Portugal, a microencapsulação é ainda um tema em desenvolvimento, no entanto é necessário ‘abrir horizontes’ pois esta técnica apresenta diversas vantagens na sua utilização e também é bastante relevante em várias aplicações.

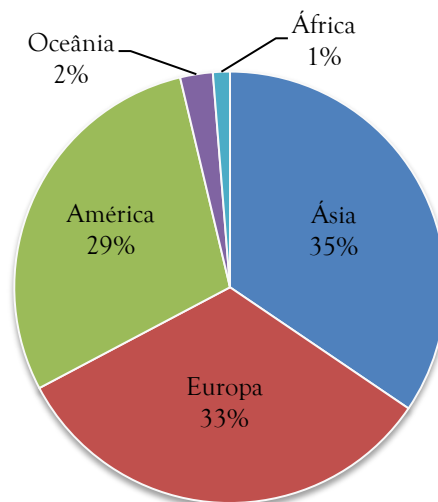


Figura 1: Distribuição das publicações sobre microencapsulação por continentes desde 1960 até ao presente, segundo a base de dados Scopus (Scopus, 2014).

A técnica de microencapsulação é usada sobretudo na indústria alimentar, farmacêutica, têxtil e cosmética, sendo que nesta em particular, a microencapsulação tem a capacidade em associar produtos incompatíveis, preservar produtos voláteis, permitir uma libertação controlada do princípio encapsulado, proteger substâncias ou mascarar odores (Robert-Blondel, 2014).

Na indústria cosmética em específico, além das vantagens já referidas, a microencapsulação permite ter uma grande facilidade na escolha do mecanismo de libertação do princípio ativo (Fairhurst &

Loxley, n.d.). Este mecanismo é assim escolhido face à finalidade da substância encapsulada uma vez que o uso da técnica de microencapsulação nos cosméticos compreende diversos produtos. Exemplos destes são perfumes, desodorizantes e ainda os produtos direcionados para a pele ou cabelo sendo que o conceito de libertar um princípio ativo num local específico é usado em protetores solares, cremes faciais, cremes anti-rugas, libertação de sabores ou fragrâncias ou marcadores sensoriais. Nos produtos direcionados para o cabelo, shampoos, agentes anti-estáticos, produtos de coloração ou tintas são alguns exemplos do uso da técnica de microencapsulação (Martins, 2012; Robert-Blondel, 2014).

Apesar de existirem variados materiais que funcionam como princípio ativos (óleos essenciais, enzimas, proteínas, perfumes, etc), este é escolhido perante a aplicação final do produto. Na cosmética o mais usual é encapsular óleos essenciais pois devido à sua composição, apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes e características aromáticas e medicinais (Walentowska & Foksowicz-Flaczyk, 2013). O estudo destas características deverá ser aprofundado, pois presentes em cremes faciais (por exemplo) poderão ser uma mais-valia na saúde no que toca à sua aplicação e desenvolvimento.

São empresas como a Robert Blondel Cosmetics (Robert-Blondel, 2014), Lipo Technologies Inc., (LipoTechnologies, 2014), Orlandi (Orlandi, 2014) ou Altana (Altana, 2014) que contribuem para a crescente produção de cosméticos cujas formulações passam pela técnica de microencapsulação.

1.2 OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE

O objetivo desta tese centra-se na microencapsulação de óleos essenciais. Através de um método inovador de coacervação, já testado (Martins, 2012) o objetivo final é produzir microcápsulas de ácido poli (lático-co-glicólico), PLGA, um polímero biodegradável, contendo como princípio ativo Óleo essencial de Tomilho. Posteriormente à formulação das microcápsulas, outro dos objetivos desta tese é estudar a capacidade antimicrobiana do Óleo de Tomilho a fim de se verificar a incorporação das microcápsulas em cosméticos, uma vez que este óleo essencial apresenta na sua composição determinados compostos que exibem uma atividade antimicrobiana e antioxidante. Por fim, o último objetivo deste trabalho são os estudos de difusão do princípio ativo.

De forma a verificar a viabilidade das microcápsulas produzidas serão usadas essencialmente três técnicas de caracterização: a microscopia ótica com fim a verificar a morfologia das microcápsulas, a análise do tamanho de partículas que possibilita a determinação do diâmetro médio e posterior espessura da membrana das microcápsulas e a cromatografia gasosa que permite quantificar o Óleo de Tomilho encapsulado obtendo-se assim as eficiências de encapsulação em particular dos componentes principais do óleo bem como a eficiência de encapsulação geral. Com o intuito de averiguar a capacidade antimicrobiana das microcápsulas serão realizados testes antimicrobianos. Por fim, para os estudos de difusão do princípio ativo será quantificado através de cromatografia gasosa o principal componente deste, o Timol.

A apresentação desta tese resume-se a quatro capítulos. No “*Capítulo 1: Introdução*”, é apresentada a relevância e motivação bem como os principais objetivos e a estrutura base da tese. No “*Capítulo 2: Contexto e Estado da Arte*” é feita uma abordagem dos conceitos relevantes ao tema, desde os princípios ativos, os materiais de parede até às técnicas de microencapsulação, mecanismos de difusão e aplicações finais, como também uma abordagem dos desenvolvimentos já existentes nesta área. O “*Capítulo 3: Descrição Técnica*” visa descrever os reagentes usados, os procedimentos adotados durante o trabalho experimental, as técnicas de caracterização, os resultados obtidos e a sua discussão. O “*Capítulo 4: Conclusões*” apresentam as principais conclusões e os próximos passos que se poderão dar nesta área. Por fim, todos os conteúdos que suportam este trabalho estão referenciados na *Bibliografia*.

1.3 CONTRIBUTOS DO TRABALHO

O trabalho desenvolvido teve por base o trabalho elaborado por Martins (2012), que estudou a microencapsulação de óleos essenciais em PLA, tornando-se assim uma continuação deste. Os estudos de microencapsulação de óleos essenciais em PLGA foram realizados no LSRE - *Laboratory of Separation and Reaction Engineering*, considerando assim este trabalho uma mais-valia para o laboratório, uma vez que uma das suas áreas de investigação recai nomeadamente na microencapsulação.

O principal contributo deste trabalho reincide na possível incorporação futura das microcápsulas de PLGA com óleos essenciais em cosméticos. Vários trabalhos de microencapsulação de óleos ou perfumes têm sido desenvolvidos, possibilitando assim uma investigação contínua nesta área uma vez que permite diversas aplicações finais do produto. Na cosmética, a microencapsulação ganha relevância uma vez que possibilita a difusão do princípio ativo encapsulado. Neste trabalho em particular, a futura incorporação das microcápsulas com óleo essenciais em cosméticos, deve-se sobretudo à capacidade antimicrobiana presente nos componentes do óleo

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 MICROCÁPSULAS

2.1.1 Definição

O processo de microencapsulação consiste em revestir partículas de uma determinada substância com uma película fina, isto é, um filme de outro composto, normalmente polimérico (Bansode et al., 2010; Umer et al., 2011) (Figura 2). As partículas formadas apresentam dimensões entre 1 e 1000 μm e são constituídas por um material interno, o *núcleo*, onde se encontra o princípio ativo e por um material externo, a *membrana*, cuja função passa pelo revestimento e proteção do material acondicionado na microcápsula (Umer et al., 2011).

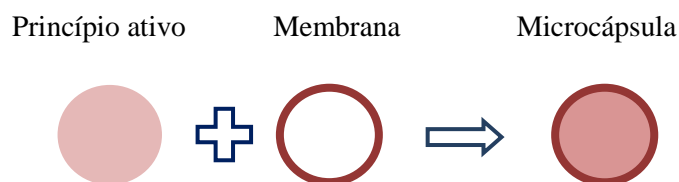


Figura 2: Composição de microcápsulas.

Relativamente ao núcleo, este pode ser designado por fase interna ou princípio ativo. Quando se apresenta sob a forma líquida, o princípio ativo pode estar disperso ou dissolvido (Umer et al., 2011). São exemplos os óleos essenciais (Martins, 2012). Quando o núcleo é sólido este pode ser fruto de uma mistura de constituintes ativos, estabilizadores, diluentes ou aceleradores (Umer et al., 2011). Exemplos de um núcleo sólido são os minerais ou dextrinas (Encapsys, 2013). Relativamente à membrana e à sua natureza esta poderá ser natural, semi sintética ou composta por um polímero sintético (Umer et al., 2011). Para além de ser chamada de parede, também apresenta designações como membrana, fase externa, concha ou matriz (Cheng et al., 2008). O material de parede não deve reagir com o princípio ativo (Umer et al., 2011), devendo assim ter a capacidade de formar uma membrana à volta deste, originando a microcápsula (Dubey et al., 2009).

2.1.2 Morfologia

Regularmente, o núcleo de uma microcápsula apresenta uma configuração esférica, tal como acontece com a própria microcápsula (Umer et al., 2011). Assim, é possível caracterizar as microcápsulas relativamente à sua morfologia em três formas: mononuclear, polinuclear ou matriz (Dubey et al., 2009).

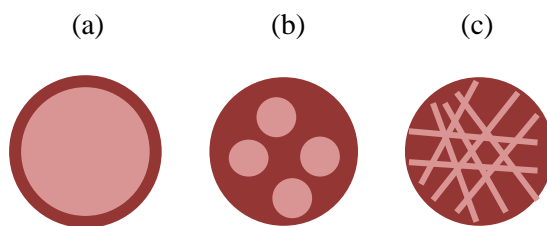


Figura 3: Morfologias das microcápsulas: (a) mononuclear, (b) polinuclear, (c) matriz.

Quando se trata de uma microcápsula mononuclear, significa que esta apresenta apenas um núcleo e este está envolvido pelo material de parede (Figura 3(a)). Quando a microcápsula é polinuclear, esta contém vários núcleos, todos eles cercados pela mesma membrana (Figura 3 (b)) (Umer et al., 2011). Quando a morfologia é do tipo matriz esta indica que os princípios ativos estão integrados dentro da matriz do material de parede (Figura 3(c)).

Os três tipos de morfologia são condicionados pelo material de parede escolhido e pela técnica de microencapsulação usada (Dubey et al., 2009).

2.1.3 Background histórico

O conceito de microencapsulação surgiu pela primeira vez em 1930 aquando da utilização da técnica de *spray drying* (Cheng et al., 2008). Ainda por volta desse ano, Bungerburg de Jong e Kass desenvolveram um processo de microencapsulação de esferas de gelatina usando a técnica de coacervação (Kumar et al., 2013).

No entanto, foi em 1954 que surgiu a primeira aplicação significativa da microencapsulação: o papel de cópia sem carbono. Barrett Green e Lowell Schleicher desenvolveram este produto através do uso da técnica de coacervação para a empresa americana National Cash Register®. O papel de cópia (Figura 4) continha microcápsulas de tinta, que por sua vez, continha uma baixa percentagem de pigmentos (2 a 6%). Quando ocorria pressão por parte de uma caneta ou lápis no papel, as microcápsulas quebravam-se e o pigmento era libertado. Devido às mudanças de pH a sua cor alterava, levando assim à formação da cópia (Brasileiro, 2011; Dubey et al., 2009).

Após 1954, outros produtos que usavam o método de microencapsulação foram surgindo. Em 1960, J.L. Fergason desenvolveu microcápsulas de cristais líquidos por coacervação de gelatinas a fim de obter dispositivos termossensíveis (Dubey et al., 2009). Por volta da década de 80, a NASA utilizou a microencapsulação de PCM's (*Phase*



Figura 4: Papel de cópia sem carbono (Hiwtc, 2014).

Change Materials) nos fatos espaciais de modo a reduzir o impacto das altas variações de temperatura sentidas pelos astronautas (Nelson, 2002).

Nos dias de hoje, em pleno século XXI, a microencapsulação é usada numa vasta gama de aplicações, como a indústria têxtil, indústria farmacêutica, agricultura, medicina ou cosméticos (Cheng et al., 2008). O uso da técnica de microencapsulação tem aumentado ao longo dos anos e isso verifica-se pelo número de artigos publicados, o que mostra a Figura 5.

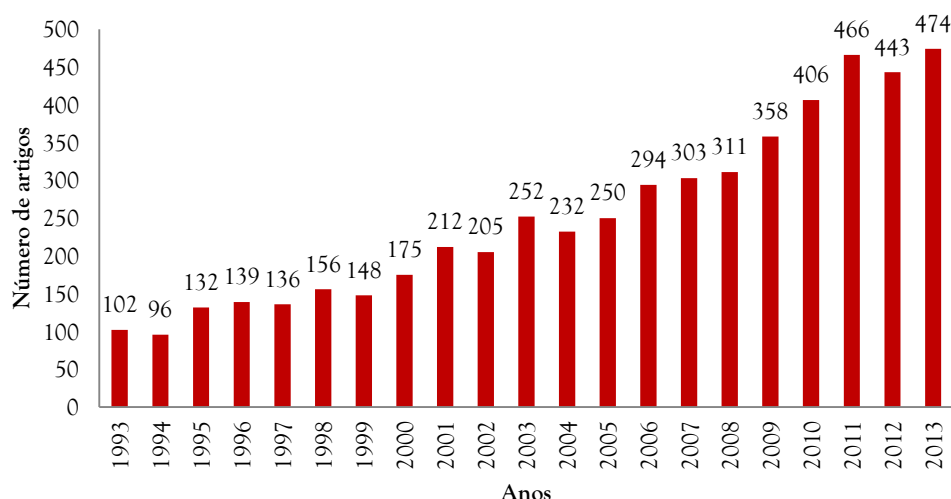


Figura 5: Número de artigos publicados nos últimos vinte anos, retirado da base de dados Scopus, palavras-chave “microencapsulation” + tipo de documento “article” + ano (Scopus, 2014).

Pela Figura 5 é possível concluir que, nos últimos vinte anos, apesar de algumas oscilações de ano para ano, o estudo e desenvolvimento da técnica de microencapsulação tem tendência a aumentar. É de salientar ainda que, segundo a base de dados Scopus, desde 1960 até aos dias de hoje contabilizam-se 5876 artigos publicados sobre microencapsulação. No presente ano, 2014, já se contabilizam 257 artigos publicados (Scopus, 2014).

2.1.4 Benefícios da Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica bastante usada, quando o objetivo principal é isolar um determinado princípio ativo do ambiente que o rodeia e que o pode adulterar e quando se pretende controlar a difusão do princípio ativo.

Assim poderão ser considerados como benefícios:

1. A estabilidade do material encapsulado, promovendo a proteção deste contra os agentes atmosféricos (luz, humidade, calor, oxigénio) (Brasileiro, 2011);
2. A separação de componentes incompatíveis por razões funcionais (Dubey et al., 2009);
3. O melhoramento das propriedades do princípio ativo, possibilitando mascarar propriedades indesejadas deste como o odor, sabor ou cor (Brasileiro, 2011; Dubey et al., 2009);

4. A transformação do estado físico dos princípios ativos a fim de uma melhor manipulação destas (Brasileiro, 2011);
5. A proteção do ambiente que envolve as microcápsulas do próprio princípio ativo (Dubey et al., 2009);
6. A fácil produção com uma boa reprodutibilidade, fácil incorporação de vários princípios ativos e fácil administração comparativamente a outros dispositivos (X. S. Wu, 2004);
7. A diminuição da volatilidade, impossibilitando a perda do material encapsulado (Brasileiro, 2011);
8. A liberação direcionada e controlada do material encapsulado (Umer et al., 2011) e
9. O aumento do tempo de conservação da microcápsula (Brasileiro, 2011).

Todos estes benefícios da microencapsulação levam a que esta técnica apresente uma enorme flexibilidade, uma vez que é usada em diversas aplicações, desde a alimentação aos cosméticos.

2.1.5 Materiais de Encapsulação (Polímeros Biodegradáveis)

Como já foi referido, sabe-se que o processo de microencapsulação consiste em revestir através de uma membrana um princípio ativo. O material da membrana ou parede deve ser selecionado tendo em conta alguns fatores essenciais neste processo como a compatibilidade para com o método de encapsulação usado, a difusão do princípio ativo através da membrana ou se o próprio material de parede satisfaz os objetivos e os requisitos do processo. Assim, o material de revestimento deve permitir a formação de um filme que envolva o princípio ativo, de forma a verificar-se uma certa compatibilidade química. No entanto, o material de parede não pode ser reativo, isto é, não pode reagir com o material encapsulado. A membrana deve apresentar também propriedades que promovam o revestimento, como a flexibilidade, a força, a impermeabilidade e a estabilidade. Alguns dos exemplos de materiais usados como membrana são as ceras e os lípidos, os polímeros naturais e os polímeros sintéticos.

As ceras e lípidos (óleos ou parafinas por exemplo) são usados como material de revestimento. No entanto, uma grande parte destes materiais são apenas compatíveis com alguns métodos de encapsulação usados (Bansode et al., 2010; Umer et al., 2011).

Os polímeros de origem natural, como por exemplo as proteínas (albumina de soro bovino (BSA); colagénio, hemoglobina, etc) ou os polissacarídeos (quitosano) estão presentes em estudos de liberação de princípios ativos no entanto apresentam desvantagens consideráveis, nomeadamente o seu custo elevado e um duvidoso grau de pureza (Jain, 2000; S et al., 2012).

Por outro lado, os polímeros de origem sintética podem ser usados para encapsular princípios ativos, sendo que a escolha do polímero sintético está relacionada com o objetivo da aplicação final. Os polímeros sintéticos podem ser classificados em biodegradáveis e não biodegradáveis. Os polímeros não biodegradáveis (poliestireno, poliacrilamida, por exemplo), como próprio nome indica, não se degradam pelo que é necessário intervir aquando da sua remoção após o fim da sua função.

Por outro lado, os polímeros sintéticos biodegradáveis apresentam propriedades como a biocompatibilidade, a biodegradação, a resistência mecânica, a capacidade de se libertarem dos solventes ou outros compostos usados durante os processos de produção de microcápsulas e a ausência de qualquer sabor quando se tratam de produtos farmacêuticos para consumo oral (Severino et al., 2011).

Dentro dos polímeros sintéticos biodegradáveis encontram-se os poliésteres alifáticos como: o PLA - ácido Polilático (Figura 6(a)), o PGA - ácido Poliglicólico (Figura 6(b)) ou o PLGA - ácido Poli (lático-co-glicólico) (Figura 6(c)) que apresentam numerosas vantagens nesta área uma vez que possuem uma excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. Entre 1960 e 1970 foram vários os trabalhos desenvolvidos utilizando esta categoria de polímeros a fim de fabricar fibras que apresentariam boas propriedades mecânicas, baixa toxicidade e excelente biocompatibilidade. Também o uso destes polímeros em materiais de sutura levaram ao reconhecimento destes no que tocava a aplicações médicas. O primeiro estudo sobre a libertação de medicamentos usando PLA foi elaborado por Boswell, Yolles, Sinclair, Wise e Beck (Lewis, 1990; X. Wu, 1995a, 1995b), levando assim a um contínuo estudo sobre esta temática bem como o uso destes polímeros em diversos dispositivos como microcápsulas, nanopartículas, implantes ou filmes (Jain, 2000).

Como é possível observar pela Figura 6, o PLA apresenta um grupo metil ($-\text{CH}_3$) e o PGA um grupo hidroxilo ($-\text{OH}$). A presença do grupo $-\text{OH}$ no PGA torna o composto polar pelo que comparado com o PLA é mais hidrófilo. Uma vez que o PLGA contém na sua constituição ácido láctico (como o PLA) e ácido glicólico (como o PGA), este será sempre mais hidrofóbico relativamente ao PGA, sempre mais hidrófilo comparativamente ao PLA. A hidrofobicidade do PLGA em relação ao PGA permite que este absorva menos água e que se degrade mais lentamente (Makadia & Siegel, 2011).

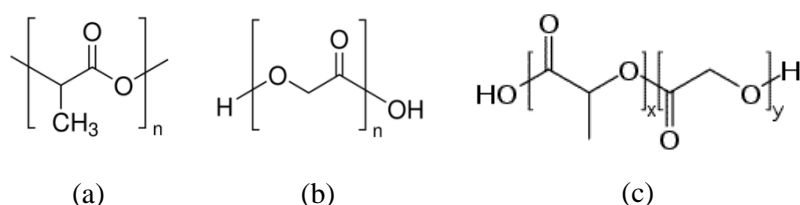


Figura 6: (a) ácido Polilático (PLA); (b) ácido Poliglicólico (PGA); (c) ácido Poli (lático-co-glicólico) (PLGA) onde x refere-se ao ácido láctico e y ao ácido glicólico.

A cristalinidade do PLGA advém da razão dos monómeros constituintes do polímero, podendo afirmar-se então que o peso molecular quer do ácido láctico, quer do ácido glicólico, está relacionado com a cristalinidade do PLGA. Normalmente é no PLGA 50:50 que a hidrólise ocorre mais rapidamente comparativamente aos polímeros cuja razão difere (75:25, por exemplo). Para além da razão de monómeros, também a resistência mecânica, a dilatação, a capacidade de hidrólise e a taxa de biodegradação são fatores que condicionam a sua cristalinidade. Sabe-se também que o peso molecular do polímero além de influenciar a cristalinidade também influencia a temperatura de transição vítrea (T_g). A T_g é assim definida como a temperatura a qual o polímero se torna vítreo. O PLGA apresenta uma T_g de

37 °C, no entanto esta diminui à medida que o monómero de ácido láctico diminui como também diminui quando o peso molecular do polímero decresce.

Outra propriedade a ter em conta é a resistência mecânica do PLGA uma vez que o polímero é usado em dispositivos de libertação de medicamentos. De forma a garantir uma boa resistência mecânica é necessário salvaguardar outros fatores que influenciam esta propriedade. São eles o peso molecular, a razão ácido láctico/ácido glicólico, a cristalinidade e a geometria da cadeia.

A taxa de biodegradação é outra propriedade de grande relevância quando se fala deste polímero, uma vez que esta ocorre uniformemente através da sua membrana. A biodegradação do PLGA além de depender da razão ácido láctico/ácido glicólico, do peso molecular do polímero e do grau de cristalinidade, também depende da sua temperatura de transição vítrea (Jain, 2000).

É possível verificar que estas três propriedades estão interligadas, no sentido que dependem maioritariamente dos mesmos fatores: peso molecular e a razão dos constituintes.

2.1.6 Princípios Ativos: óleos essenciais

Na microencapsulação é possível afirmar que as microcápsulas funcionam como pequenos reservatórios onde um princípio ativo, situado no núcleo, está protegido por uma membrana (Brasileiro, 2011). Como referido anteriormente, o princípio ativo pode apresentar-se na forma líquida ou sólida, possibilitando assim encapsular diversos materiais, tornando-se bastante flexível. Ou seja, o facto de ser possível variar a composição do núcleo leva a que sejam usadas as características do princípio ativo encapsulado para desenvolver as propriedades desejadas na produção das microcápsulas. Quer isto dizer que a escolha do princípio ativo tem por bases as suas propriedades características e a intenção de encapsulação, possibilitando obter determinado produto final.

Tomando o exemplo de um fármaco (aspirina) e de cristais líquidos, sabe-se que o primeiro é um sólido ligeiramente solúvel em água e que o segundo, como o próprio nome indica, apresenta-se sob a forma característica de um líquido. Perante as suas propriedades, a aspirina é usada sob a forma de comprimidos ou cápsulas, a fim de camuflar o sabor ou sustentar a libertação enquanto os cristais líquidos são usados na conversão de líquidos em sólidos ou como estabilizadores sob a forma de filmes flexíveis para o mapeamento térmico do corpo humano (Umer et al., 2011).

Tal como o material de parede, também os princípios ativos são escolhidos perante a aplicação desejada. Na Tabela 1 é possível verificar alguns exemplos de materiais que podem ser encapsulados e a sua respetiva aplicação.

É de referir que estão representadas apenas algumas gamas de princípios ativos, existindo assim um rol de materiais possíveis de encapsular conseguindo abranger várias áreas de aplicação: desde da indústria têxtil, passando pela medicina ou agricultura.

Tabela 1: Princípios ativos usados em microencapsulação e respectivas aplicações.

Princípio ativo	Aplicação
Perfumes	Industria Têxtil (Rodrigues et al., 2009)
Inseticidas	Agricultura (proteção de culturas) (Dubey et al., 2009)
Proteínas	Vacinas, fármacos (Choi et al., 2010)
Enzimas	Biocatálise (Dubey et al., 2009)
Compostos orgânicos	Biosensores (Dubey et al., 2009)
Óleos essenciais	Cosméticos (Martins et al., 2014)
Bactérias	Dispositivos biomédicos (Della Porta et al., 2012)
PCM's	Industria Têxtil (Dubey et al., 2009)
Células microbianas	Processos Biotecnológicos (Rathore et al., 2013)

Relativamente à microencapsulação de óleos essenciais é importante referir que estes são usados não só devido às suas características aromáticas e condimentais, mas também devido às suas características medicinais como a atividade antioxidante, anti-inflamatória ou antimicrobiana (Martins et al., 2014; Solomon et al., 2012). Estas propriedades (antioxidante e antimicrobiana) dos óleos devem-se sobretudo à presença de classes de compostos como os terpenos alifáticos, éteres e hidrocarbonetos de terpenos aromáticos (Dima et al., 2014). É de salientar que tanto a origem como a composição e as percentagens mais significativas dos componentes presentes no óleo influenciam as suas propriedades finais (Martins et al., 2014; Walentowska & Foksowicz-Flaczyk, 2013). A Tabela 2 apresenta a variedade de óleos que são possíveis encapsular bem como a sua aplicação.

Tabela 2: Óleos essenciais usados na microencapsulação e respectivas aplicações.

Óleos Essenciais	Aplicação
Limão	Cosmética (Martins et al., 2014)
Tomilho	Cosmética, têxtil (Walentowska & Foksowicz-Flaczyk, 2013)
Citronela	Repelentes, área farmacêutica (Solomon et al., 2012)
Vanilina	Cosmética (Martins et al., 2014)
Mentol	Industria Alimentar (Sootitawat et al., 2005)
Eucalipto	Repelentes (Martins et al., 2014)
Hortelã-Pimenta	Alimentação (Martins et al., 2014)
Pimenta	Industria Alimentar, cosmética, tratamento de doenças (Dima et al., 2014)
Café	Industria alimentar (Frascareli et al., 2012)
Oregão	Tratamento de doenças, indústria alimentar (Almeida et al., 2013)
Canela	Industria Alimentar (Melgarejo-Flores et al., 2013)
Lavanda	Perfumes (Ocak, 2012)

Apesar do uso de óleos essenciais em diversas aplicações na atualidade, é de realçar que estes já eram usados em tempos ancestrais, uma vez que eram extraídos de plantas aromáticas e utilizados como especiarias, devido ao seu sabor ou fragrâncias (Walentowska & Foksowicz-Flaczyk, 2013). A microencapsulação de óleos essenciais também permite evitar a instabilidade química criada pelo ar, luz, altas temperaturas e humidade, sendo estes os fatores responsáveis pela rápida degradação e evaporação dos princípios ativos (Raileanu et al., 2013).

Entre os cerca de 3000 óleos essenciais conhecidos (Walentowska & Foksowicz-Flaczyk, 2013), o Óleo de Tomilho encontra-se no ‘Top 10’ de óleos essenciais devido as suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes e por funcionar como conservante de alimentos. De nome científico *Thymus vulgaris* L., tomilho-vulgar (Figura 7(a)), pertence a família Lamiaceae e é oriundo da zona mediterrânea e asiática, mas é nos continentes americano, europeu e africano que possui um significativo interesse económico. Sabe-se que desta família de plantas existem cerca de 215 espécies entre arbustos aromáticos ou perenes (Badi et al., 2004; Pirbalouti et al., 2013).



Figura 7: (a) A planta de Tomilho (Utad, 2014); (b) folhas de Tomilho seco usadas como especiarias.

Entre os vários componentes deste óleo destacam-se cinco: Terpineno, Quimeno, Linalol, Timol e Carvacrol. As fórmulas químicas destes componentes estão apresentadas na Figura 8.

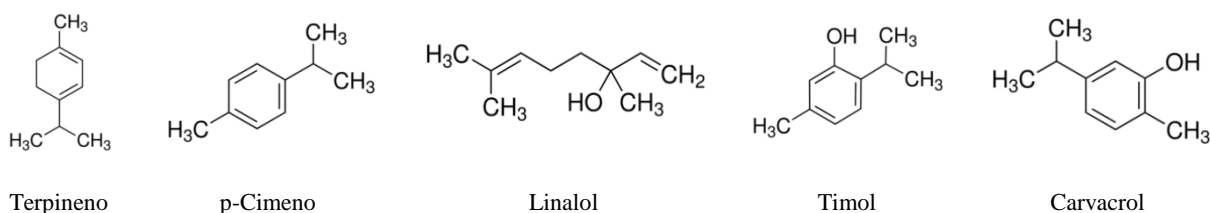


Figura 8: Fórmulas químicas dos compostos principais do Óleo de Tomilho.

É de referir que, segundo estudos, as propriedades antimicrobianas, antioxidantes e inseticidas do tomilho estão relacionadas com a presença dos compostos fenólicos, Timol e Carvacrol, tal como acontece no oregão (Almeida et al., 2013; Walentowska & Foksowicz-Flaczyk, 2013). Sabe-se também que o Carvacrol é responsável por uma significativa atividade antibiótica na *Thymus revolutus*, o que se supõe que também seja responsável pela mesma atividade na *Thymus vulgaris* L (Walentowska & Foksowicz-Flaczyk, 2013).

Apesar de existirem vários métodos para a extração de óleos essenciais, hidrodestilação, destilação por arrastamento de vapor, extração por super-crítico ou extração por solvente, sabe-se que o método usado para a extração do Óleo de Tomilho recai na destilação a vapor. Para esse efeito, devem ser usadas as folhas (posteriormente secas, como mostra a Figura 7(b)) da época em que a planta floresce, uma vez que há uma maior produção de óleo quando a planta está “em flor” (Gavahian et al., 2012). É possível distinguir dois tipos de Óleos de Tomilho: o Vermelho e o Branco. O Óleo de Tomilho Vermelho é conseguido através da destilação das folhas secas do tomilho enquanto o Óleo de Tomilho Branco é uma re-destilação do Óleo de Tomilho Vermelho (Martins, 2012).

O Tomilho é frequentemente usado como planta aromática (Utad, 2014), na indústria alimentar (chás de ervas e especiarias), para fins medicinais ou na cosmética. Nesta, o processo de microencapsulação possibilita a adição de propriedades funcionais (antimicrobianas por exemplo) à indústria dos cosméticos, correspondendo por vezes às necessidades do consumidor (Martins, 2012; Pirbalouti et al., 2013).

2.2 TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO

Relativamente às técnicas de microencapsulação estas são agrupadas em três grandes grupos: químicas, físico-mecânicas e físico-químicas. Perante a vasta quantidade de técnicas possíveis para produzir microcápsulas, um dos fatores a ter em conta na escolha do método é a natureza do princípio ativo (Jyothi et al., 2010). A Tabela 3 apresenta os métodos que serão descritos seguidamente bem como o seu respetivo diâmetro. Apesar da gama de diâmetros possíveis de cada método, este pode ser adaptado de forma a obter-se o diâmetro desejado.

Tabela 3: Tamanho da partícula produzida segundo o método utilizado.

Tipo de Método	Métodos de Microencapsulação	Tamanho da partícula /Diâmetro (µm)
Químicas	Polimerização Interfacial	20-30 (Trino, 2012)
	Polimerização <i>In Situ</i>	1-500 (Brasileiro, 2011)
Físico-Mecânicas	<i>Spray Drying</i>	10-300 (Trino, 2012)
	<i>Air Suspension Coating</i>	20-100 (Severino et al., 2011)
	Extrusão Centrífuga	400-2000 (Bansode et al., 2010)
	<i>Pan Coating</i>	600-5000 (Brasileiro, 2011)
Físico-Químicas	Evaporação por Solvente	600 (Jyothi et al., 2010)
	Rápida Expansão do fluido Supercrítico	0,5 – 500 (Carvalho, 2011)
	Coacervação	20-200 (Trino, 2012)

2.2.1 Técnicas Químicas

Polimerização Interfacial

Neste método químico de microencapsulação, a membrana da microcápsula é formada na superfície ou sobre a mesma através da reacção de polimerização dos monómeros reativos. Assim os monómeros (multifuncionais) são dissolvidos no material líquido que será encapsulado e esta solução será adicionada a fase aquosa que contém um agente dispersivo (Cheng et al., 2008).

Polimerização *In situ*

À semelhança do que acontece na polimerização interfacial, também neste processo, a membrana é formada através da polimerização dos monómeros adicionados à reacção. No entanto, neste caso a polimerização dá-se apenas na fase contínua e não na interface entre o núcleo e a fase contínua. (Cheng et al., 2008).

2.2.2 Técnicas Físico-Mecânicas

Spray Drying (Atomização)

Esta técnica baseia-se na pulverização de uma dispersão sólido-em-óleo ou de uma emulsão água-em-óleo numa corrente de ar quente, onde está presente o material de parede levando assim à sua secagem e formação de microcápsulas (Makadia & Siegel, 2011). Ou seja, as partículas sólidas e secas formam-se após o aprisionamento da solução que contém o princípio ativo na membrana (Cheng et al., 2008). Normalmente, o solvente usado depende da substância a encapsular, se esta é hidrofílica ou hidrofóbica. A natureza do solvente usado, a temperatura usada na evaporação do solvente no processo e o caudal de alimentação influenciam o tamanho final das microcápsulas (Makadia & Siegel, 2011).

Este processo é económico (Dubey et al., 2009), rápido, adequa-se facilmente à escala industrial (Makadia & Siegel, 2011) e permite encapsular materiais instáveis, uma vez que o tempo de secagem é reduzido (Bansode et al., 2010). Apesar de ser usado para encapsular fragrâncias e óleos (Dubey et al., 2009), estes podem-se perder durante o processo, caso o ponto de ebulição seja muito baixo. Outra desvantagem será a possível adesão das microcápsulas às paredes do equipamento (Cheng et al., 2008).

Air Suspension Coating

Este método de microencapsulação tem como fundamento a dispersão do princípio ativo numa corrente de ar e o revestimento por aspersão das partículas suspensas na corrente (Kumar et al., 2013). Os princípios ativos sólidos são colocados inicialmente numa câmara de revestimento de forma a ficarem suspensos na corrente de ar. Daí passam por um orifício onde são então pulverizados pelo material de revestimento. Após a evaporação do solvente, as partículas agora revestidas voltam ao local inicial, isto é, passam novamente pelo orifício para voltarem a ser revestidas. O ciclo é repetido até as microcápsulas apresentarem a espessura desejada. Esta técnica é usada para encapsular cristais, pós ou comprimidos (Cheng et al., 2008).

É uma técnica que possibilita um maior controlo e maior flexibilidade (Bansode et al., 2010), pois permite controlar por exemplo a espessura das microcápsulas e é bastante flexível no que toca a variedade de materiais usados como revestimento.

Extrusão Centrífuga

Neste processo é utilizado uma extrusora, cuja cabeça é rotativa e dispõe de cerca de 16 orifícios concêntricos (Bansode et al., 2010). O princípio ativo é bombeado para um tubo central enquanto o material de parede é bombeado para dois tubos que se dispõem lado a lado do tubo central. No final de ambos os tubos, encontra-se o orifício concêntrico e é neste local que se dá a formação das microcápsulas,

uma vez que a membrana se vai formando ao longo do tubo e aquando da presença do orifício concêntrico, o material que será encapsulado flui para a membrana.

As microcápsulas produzidas podem apresentar um diâmetro na gama entre 400 e 2000 μm . Uma desvantagem que este método possui é que só é possível encapsular líquidos (Cheng et al., 2008).

Pan Coating

O processo de *Pan Coating* é considerado um dos processos mais antigos no que toca a produção de pequenas partículas ou comprimidos revestidos (Bansode et al., 2010). Este processo é usado essencialmente na indústria farmacêutica e baseia-se na rotação de um recipiente, isto é, um tambor concêntrico, onde as partículas, também em rotação, são revestidas lentamente com o material de parede (Cheng et al., 2008). O material de parede pode estar sob a forma de solução ou então ser pulverizado para as partículas (Bansode et al., 2010). Este processo requer o controlo de temperatura (Cheng et al., 2008). O diâmetro e a velocidade do tambor, o tamanho do núcleo ou o tempo de revestimento das microcápsulas são alguns dos fatores que influenciam este processo (Bansode et al., 2010).

Evaporação por Solvente / Extração por Solvente

Este método de microencapsulação, evaporação por solvente, baseia-se essencialmente em quatro passos. Inicialmente o agente ativo e a substância usada como membrana são dissolvidos num solvente orgânico. Após a dissolução completa, ocorre numa segunda etapa, a emulsão desta fase orgânica (fase dispersa) numa fase aquosa, também chamada de fase contínua. A extração do solvente dá-se então da fase dispersa para a fase contínua, sendo que a evaporação do solvente ocorre através do aumento de temperatura, permitindo assim a presença de partículas sólidas na fase dispersa, ou seja, das microcápsulas. Por fim, as microcápsulas passam por um processo de filtração e secagem, possibilitando assim a eliminação do solvente residual.

Este método é usado essencialmente na indústria farmacêutica. É exemplo o paracetamol que é encapsulado por esta método de forma a mascarar o seu sabor (Trino, 2012).

2.2.3 Técnicas Físico-Químicas

Rápida Expansão do fluido supercrítico

Neste processo, o fluido supercrítico, normalmente dióxido de carbono (CO_2), alcanos (C_2 , C_3 ou C_4) ou óxido nitroso (N_2O), é mantido a altas pressões e contém nele o princípio ativo e o material de parede. O mesmo fluido rapidamente passa por um pequeno orifício que se encontra a pressão atmosférica. Ou seja, a repentina queda de pressão provoca a dissolução e posterior deposição do material de parede à volta do princípio ativo, formando assim as microcápsulas (Dubey et al., 2009).

Coacervação (Separação de fases)

O processo de coacervação baseia-se na separação de fases, ou seja, há separação entre a fase que contém o coacervado, isto é, a fase rica em material de parede, e princípio ativo (as microcápsulas já formadas) e a fase aquosa que poderá apresentar o material que não foi encapsulado (Jain, 2000). Assim esta técnica inclui 3 passos:

- 1) A formação da emulsão óleo-em-água, na qual há dispersão do óleo numa solução aquosa juntamente com um agente tensioativo;
- 2) A formação das partículas já revestidas onde a membrana se forma rodeando o material do núcleo;
- 3) A solidificação das microcápsulas através da adição de um agente endurecedor (Martins et al., 2014).

Após os três passos, as microcápsulas são sujeitas a um processo de lavagem, peneiração, filtração ou centrifugação e por fim um processo de secagem (Jain, 2000).

Esta técnica pode ser aplicada em dois tipos de soluções: aquosa ou orgânica. Em fase aquosa, só é possível a encapsulação de substâncias insolúveis em água e em fase orgânica com a presença de solventes orgânicos é possível encapsular substâncias solúveis em água. A coacervação em fase aquosa pode ser dividida em simples ou complexa (Martins et al., 2014).

Este processo é usado para encapsular substâncias solúveis em água como péptidos, proteínas e vacinas (Jain, 2000) ou substâncias como óleos (Martins et al., 2014). A coacervação é usada sobretudo em áreas como a indústria alimentar, a cosmética ou em fragrâncias (Martins et al., 2014). Através da Figura 8 é possível observar o número de artigos publicados relativos à microencapsulação por coacervação até aos dias de hoje nas suas diferentes aplicações.

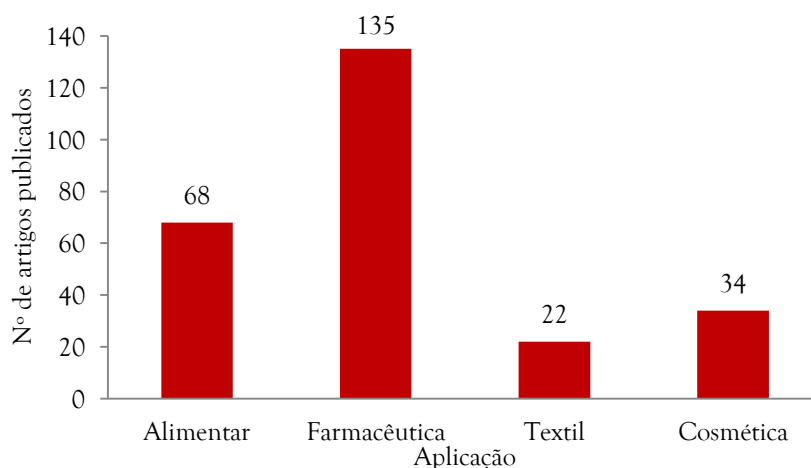


Figura 9: Número de artigos publicados desde 1960 até ao presente, retirado da base de dados Scopus, palavras-chave “microencapsulation”, “coacervation” e “application” (Scopus, 2014).

É de referir que a indústria farmacêutica detém a maior utilização do processo de microencapsulação usando a técnica de coacervação, seguindo-se da indústria alimentar e da cosmética (perfumes e sabores). Já nos têxteis, ao longo do tempo foram apenas publicados 22 artigos.

2.3 MECANISMOS DE LIBERTAÇÃO

O processo de microencapsulação baseia-se essencialmente na libertação do princípio ativo. Uma vez que este está encapsulado através de uma membrana é necessário recorrer a um determinado mecanismo para que haja a difusão deste. Assim, é possível distinguir alguns dos processos de libertação mais utilizados:

1- Rutura mecânica da parede: dá-se através da pressão exercida (ex: papel de cópia) ou por influência de forças osmóticas (Dubey et al., 2009).

2- Dissolução da parede: a libertação do princípio ativo dá-se através da dissolução da parede. Esta técnica é usada sobretudo na microencapsulação de detergentes (Dubey et al., 2009).

3- Degradação controlada de um sistema monolítico: este mecanismo baseia-se na distribuição uniforme do princípio ativo na matriz/parede. A sua difusão (lenta) só é assim possível com a degradação (rápida) da matriz, uma vez que existem fortes ligações entre ao princípio ativo encapsulado e a matriz.

4- Difusão controlada de um sistema monolítico: a difusão do princípio ativo dá-se antes ou em simultâneo com a degradação da membrana. O facto de o mecanismo ser homogéneo ou heterogéneo influencia a taxa de difusão do princípio ativo.

5- Difusão controlada de um sistema do tipo reservatório: a membrana tem a capacidade de controlar a difusão do princípio ativo através dela, degradando-se só aquando da libertação total da droga. É de referir que a degradação da membrana não interfere com a libertação do princípio ativo.

6- Erosão: neste processo, o valor de pH e a hidrólise enzimática permite a erosão da membrana de revestimento e posterior libertação do princípio ativo (Umer et al., 2011).

É de referir que a escolha do mecanismo de libertação do princípio ativo depende da aplicação final das microcápsulas produzidas (Dubey et al., 2009).

2.4 APLICAÇÕES DAS MICROCÁPSULAS

Agricultura

A microencapsulação é usada sobretudo na proteção de colheitas. Os pesticidas habituais são assim substituídos por feromonas de insetos que conseguem impedir a reprodução dos mesmos, promovendo assim o crescimento da flora. Para isso, a vegetação poderá ser pulverizada através de uma dispersão de microcápsulas cujo princípio ativo, o ‘pesticida’ natural, poderá ser revestido por poliureias, gelatinas ou gomas arábicas que o protegem da oxidação e da luz (Dubey et al., 2009).

Indústria Farmacêutica

No que toca à indústria farmacêutica, o uso da microencapsulação recai no controlo da libertação do medicamento, isto é, do princípio ativo, substituindo assim os agentes terapêuticos que não podem ser tomados por via oral, a terapia genética e o uso de vacinas para a SIDA, tumores, cancro ou diabetes. O marco que a microencapsulação deixa na indústria farmacêutica é a possibilidade de se poder ingerir os medicamentos oralmente como a insulina ou as hormonas de crescimento (Dubey et al., 2009).

Indústria alimentar

A microencapsulação, na indústria alimentar, funciona como meio de proteção do sabor, da cor, da textura e do aroma dos alimentos. Estas características podem ser modificadas pela adição de ingredientes/compostos aos alimentos de forma a aumentar o valor nutricional destes. Assim, de forma a evitar a sua lenta degradação, oxidação, ou até mesmo reação entre alimentos, é possível encapsular minerais, óleos essenciais ou vitaminas. Este processo permite assim mascarar o odor e a cor e promover a textura e a libertação do aroma desejados (Dubey et al., 2009).

Têxteis

Na indústria têxtil, o uso de tecidos inteligentes recorre ao processo de microencapsulação. São exemplos do uso desta técnica nesta área a regulação da temperatura corporal através de tecidos, os *skin softeners* (Cheng et al., 2008), ou até a mais recente aplicação que consiste na libertação de fragrâncias (Nelson, 2002).

Cosméticos

Também na cosmética o uso da microencapsulação baseia-se essencialmente na aplicação de vitaminas, óleos essenciais, agentes hidratantes para a pele, agentes de anti-envelhecimento entre outros (Cheng et al., 2008). No caso dos óleos essenciais estes podem ser usados, uma vez que determinados óleos apresentam uma grande capacidade antimicrobiana (Dima et al., 2014). A utilização da microencapsulação na indústria cosmética possibilita assim a criação de produtos que satisfaçam as

necessidades do consumidor (Martins et al., 2014), de produtos constituídos pelos mesmos ingredientes mas encapsulados apresentando assim novas propriedades, permite um controlo da libertação do princípio ativo, direcionando algumas células específicas de forma a reduzir mecanismos de pigmentação e de armazenamento e promove ainda a proteção de ingredientes instáveis, sendo que a sua formulação passa pela encapsulação destes. O uso de microcápsulas visíveis pode funcionar também como uma ferramenta de *marketing* permitindo assim a introdução de produtos inovadores no mercado (Perrier, 2012).

Na Tabela 4 estão representadas algumas patentes sobre a utilização do processo de microencapsulação em aplicações cosméticas. É possível verificar que o uso desta técnica em aplicações cosméticas não é recente, pelo que se pode observar pela patente da empresa L'Oréal em 1976. O estudo contínuo deste processo também se corrobora pelas patentes existentes nos últimos anos.

Tabela 4: Exemplos de patentes existentes sobre microencapsulação em cosméticos.

Ano	Concessionário da Patente	Patente
1976	L'Oréal	“Cosmetic composition containing microencapsulated solvents for nail enamel” (Charlé et al., 1976)
1995	The Procter & Gamble Company	“Cosmetic cleasing composition with dual blooming perfume system” (Tanner et al., 1995)
1997	Kimberly-Clark Worldwide	“Soft tissue achieved by applying a solid hydrophilic lotion” (Krzysik, 1999)
2000	Coreana Cosmetics & co Ltd	“Skin protective cosmetic base composition containing stabilized vitamin C and phytosphingosine “(Gi & Jun, 2000)
2009	Tagra Biotechnologies Ltd	“Compositions for topical application comprising microencapsulated colorants” (Kvitnitsky et al., 2011)
2009	L'Oréal	“Core/skin type capsules and preparation method” (Simmonet et al., 2009)

3 Descrição Técnica

3.1 REAGENTES E MÉTODOS

3.1.1 Reagentes

Durante o processo de microencapsulação foram usados vários reagentes. Todos os reagentes utilizados desde a formação das duas fases até ao endurecimento das microcápsulas estão dispostos na Tabela 5. Também os compostos usados para a preparação posterior dos padrões de Óleo de Tomilho (para a quantificação dos componentes do óleo e posterior cálculo da eficiência) estão apresentados na mesma tabela. É possível também observar a respetiva função de cada composto no processo.

Tabela 5: Descrição dos reagentes usados no processo de produção de microcápsulas.

Reagente utilizado	Empresa	Função
Dimetilformamida (DMF)	Sigma Aldrich®	Dissolução do PLGA
Ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA 50:50)	Aldrich	Membrana das microcápsulas
Óleo de Tomilho <i>Red</i> , Kosher	SAFC™	Princípio ativo
Óleo de Tomilho <i>White</i>	Aromol	Princípio ativo
Tergitol, type 15-S-9	Sigma®	Agente tensioativo
Octametilclotetrasiloxano (OCMTS)	Merck	Agente endurecedor
Etanol Absoluto	Merck	Padrões de Óleo de Tomilho e Preparação da solução de Pluronic
Hexano	Merck	Processo de Lavagens
Synperonic PE®/F68	Fluka	Solução de Pluronic

3.1.2 Método Experimental

O método experimental usado para a produção das microcápsulas de Óleo de Tomilho revestido com PLGA é baseado no procedimento descrito por Martins et al. (2014). Adaptando-o a este estudo, é possível verificar-se essencialmente três fases:

- I) Formação das microcápsulas;
- II) Endurecimento das microcápsulas;
- III) Separação de fases

Estas três fases serão detalhadamente descritas de seguida e estão representadas esquematicamente na Figura 10 que ilustra o procedimento experimental usado.

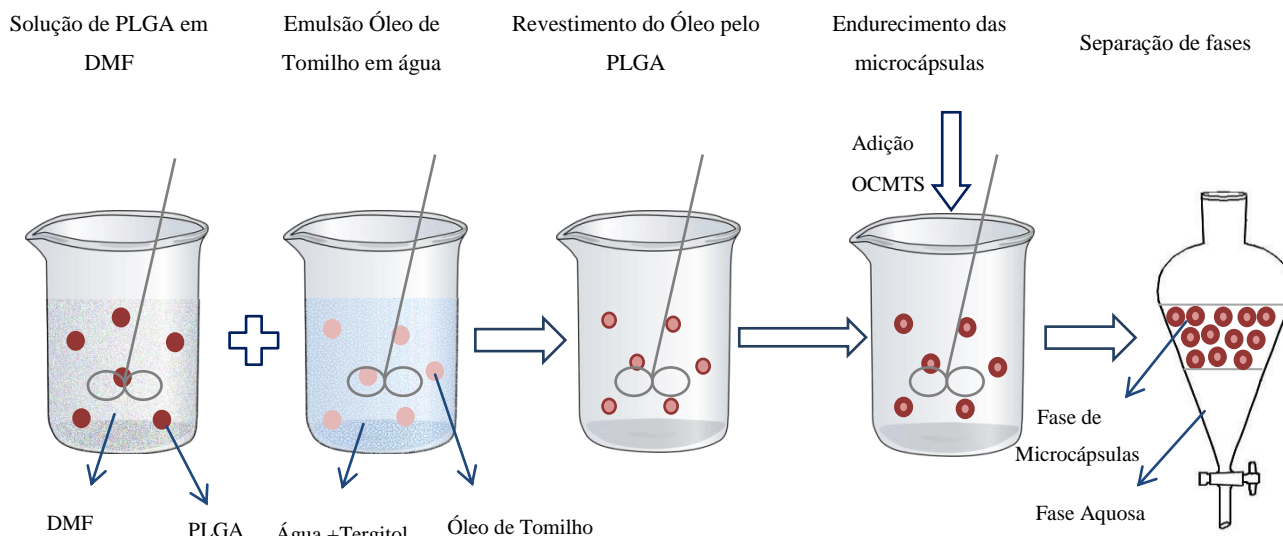


Figura 10: Representação esquemática do procedimento experimental utilizado.

I) Formação das microcápsulas: Nesta primeira etapa é necessária a preparação da solução de PLGA em DMF e a emulsão óleo-em-água de forma a permitir o revestimento do óleo através da junção destas.

→ Solução de PLGA em DMF: 0,1 g de PLGA são dissolvidos em 7 mL de DMF. O PLGA deverá estar totalmente dissolvido na DMF.

→ Emulsão óleo-em-água: 0,2 mL de Óleo de Tomilho são adicionados a 30 mL de água. A esta emulsão adiciona-se 0,98 mL do agente tensioativo, Tergitol.

→ Revestimento do óleo: A emulsão é mantida sob agitação magnética de 450 rpm e a solução de PLGA é adicionada gota a gota. Após o fim da adição, a mistura é mantida sob agitação durante 60 minutos, promovendo assim o revestimento do óleo pelo PLGA.

II) Endurecimento das microcápsulas: A consolidação é realizada através da adição de um agente endurecedor, OCMTS. Assim, a solução de microcápsulas formada anteriormente é adicionada gota a gota a 60 mL de OCMTS que está sob agitação. Adição finalizada, a mistura deverá ser mantida sob agitação durante 60 minutos.

III) Separação de fases: Após a reação, a mistura é vertida para uma ampola de decantação e é deixada a repousar cerca de 18 horas a fim de se verificar a separação de fases: a fase aquosa e a fase de coacervado (isto é, fase de microcápsulas).

Um quarto ponto pode ser adicionado ao procedimento: o processo de lavagem da solução de microcápsulas. Este processo baseia-se essencialmente em três passos:

→**Lavagem com uma solução de Pluronic (0,1 % m/m):** É adicionada a solução de Pluronic (0,1 g de Synperonic PE®/F68 dissolvida em 1 litro de água) à solução de microcápsulas num funil de decantação e aguardam-se cerca de 3 horas. Após este período obtém-se a separação de fases e é possível executar a decantação. Os volumes de solução de Pluronic e de microcápsulas deverão ser iguais.

→**Lavagem com uma solução de Etanol (30% V/V):** É adicionada a solução de Etanol à solução de microcápsulas num funil de decantação e aguardam-se cerca de 18 horas, o que permite a separação de fases. Após a separação procede-se à decantação. Mais uma vez, o volume usado de etanol deve ser igual ao volume de solução de microcápsulas que é lavado.

→**Lavagem com Hexano:** O Hexano é adicionado à solução de microcápsulas. Uma vez que o Hexano é imiscível com a solução de microcápsulas, a separação de fases é instantânea. A mistura só é possível com o auxílio de uma vareta. Após a separação procede-se à decantação. Como já foi referido anteriormente, os volumes de hexano e da solução de microcápsulas que será lavada deverão ser iguais.

É de referir que as lavagens da solução permitem essencialmente estabilizar a solução de microcápsulas, através do agente tensioativo Pluronic, e retirar os compostos polares e apolares que não foram encapsulados e poderão estar dispersos na parte exterior às microcápsulas, através do Etanol e Hexano respetivamente. É relevante ter conhecimento que esta etapa (de lavagens) só se verificou para os ensaios em que os objetivos eram os estudos da capacidade antimicrobiana e os estudos de difusão do princípio ativo.

3.1.3 Estudos da eficiência de encapsulação: Técnicas de caracterização

Análise do tamanho de partículas - Cilas 1090 Particle Size Analyzer

O equipamento de análise do tamanho de partículas, Cilas 1090 (Figura 11) apresenta um *design multi-laser* constituído por dois *lasers* colocados estrategicamente na câmara ótica possibilitando a medição do tamanho das partículas num intervalo de 0,04 a 500 microns. O Cilas 1090 apresenta uma enorme flexibilidade permitindo analisar soluções dispersas líquidas bem como sólidas. Esta flexibilidade traduz-se na forma em que para se escolher o tipo de solução basta selecionar esse método não sendo necessário efetuar nenhuma alteração ao equipamento. Os resultados são dados em volume.

O Cilas 1090 foi usado com o objetivo de se obter a dimensão das partículas produzidas, ou seja o diâmetro médio das microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho (Cilas, 2014).



Figura 11: Cilas 1090 Particle Size Analyzer (Cilas, 2014).

Microscopia ótica – Leica DM 2000

A microscopia ótica é uma técnica de análise que permite visualizar uma amostra com uma determinada ampliação. É usada na investigação, nas áreas da biologia ou medicina possibilitando por exemplo controlar medidas terapêuticas ou a examinação de amostras do corpo humano permitindo reter determinadas informações relevantes.

O microscópio ótico, Leica DM 2000, Figura 12, foi utilizado neste processo a fim de se verificar a morfologia das microcápsulas e numa primeira abordagem permitiu verificar a formação ou não destas. Relativamente à morfologia das microcápsulas esta foi observada com diferentes ampliações (100×, 200×, 400×, 1000×) quer no modo “*brigth field*”, quer no modo “*dark field*”. Enquanto o primeiro modo possibilita a iluminação uniforme da amostra, o segundo modo permite salientar a periferia das microcápsulas, identificando assim a membrana destas, neste caso específico. É possível esta observação uma vez que a luz principal é tapada, sendo a amostra atingida apenas por um feixe de luz com um determinado ângulo (Martins, 2012).



Figura 12: Microscópio ótico Leica DM 2000 (Bio Optic, 2014).

Cromatografia gasosa GC-FID/MS

O equipamento de cromatografia gasosa usado neste processo de caracterização das microcápsulas produzidas é constituído essencialmente por um aparelho denominado Varian CP 3800 onde consta o injetor com ou sem *split*, duas colunas CP WAX 52 CB polares de sílica, o detetor Varian FID e o espectrómetro de massa Varian Saturn 2000 MS. Estes equipamentos são controlados pela interface Saturn 2000 WS.

O método usado foi devidamente estruturado para as análises em questão. Assim, cada análise tinha duração de 45 minutos sendo que nos 2 primeiros minutos após a injeção da amostra no injetor a temperatura do forno seria de 50 °C. Após esse tempo, a temperatura do forno aumentava a uma taxa de 5 °C/min até aos 200 °C, mantendo-se a essa temperatura até ao final da análise. Sabe-se que o *split ratio* (fração analisada do volume que é injetado) do FID é de 1:10 e do MS é de 1/200 e que quer o injetor do FID quer o injetor do MS estão a uma temperatura de 240 °C. O volume de amostra injetado foi de 0,1 µm e o gás de arrasto, Hélio N60, apresentava um caudal de 1 mL/min.

A cromatografia gasosa GC-FID/MS permitiu averiguar a eficiência de encapsulação do princípio ativo no polímero biodegradável, ou seja a microencapsulação do Óleo de Tomilho no PLGA. Os valores que constam nos cálculos elaborados para esse fim foram baseados nas áreas dos picos dos cromatogramas fornecidos pela interface do equipamento para cada ensaio.



Figura 13: Equipamento de Cromatografia Gasosa (GC-FID).

3.1.4 Estudos da capacidade antimicrobiana: procedimento

Para estudar a presença/ausência da capacidade antimicrobiana das microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho recorreu-se ao método baseado na norma ASTM E2149-01¹ e teve como objetivo a medição do halo de inibição de uma determinada bactéria perante a amostra de microcápsulas, sendo assim um método qualitativo. Como bactéria recorreu-se à Gram Negativa (Zhanel et al., 2004) *Pseudomonas aeruginosa* e como meio de cultura microbiológico utilizou-se o Agar Mueller Hinton.

O procedimento está descrito seguidamente:

¹ Standard Test Method for Determining the Antimicrobial activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions.

- 1- A fim de se obter uma cultura pura de bactérias, inocula-se uma pastilha liofilizada de *P. aeruginosa* em caldo nutriente (NB) estéril e incuba-se durante 24 horas a uma temperatura de 37 °C.
- 2- Após a preparação e esterilização do Agar Mueller Hinton, transfere-se deste agar um volume de 35 mL para uma placa da Petri, já esterilizada.
- 3- Para a solução de *P. aeruginosa*, retira-se 1 mL do inóculo de bactérias preparado no ponto 1 e adiciona-se a 5 mL de solução de Ringer, obtendo-se assim uma concentração de bactérias de 0,5 McFarland, isto é 1.5×10^8 UFC/mL.
- 4- A solução de *P. aeruginosa* é espalhada com o auxílio de uma zaragatoa na placa de Petri preparada no ponto 2, procedendo-se assim à sua inoculação.
- 5- No centro da placa faz-se um furo com cerca de 6 mm de diâmetro e posteriormente colocam-se 100 µL da amostra de microcápsulas.
- 6- As placas de Petri são incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37 °C.
- 7- Após este tempo, procede-se à observação das placas a fim de se verificar a presença/ausência do halo de inibição. Uma vez que se verifica a presença do halo de inibição, mede-se o diâmetro deste.
- 8- Com o objetivo de se verificar se ocorria difusão do Óleo de Tomilho (encapsulado nas microcápsulas de PLGA), prolonga-se a incubação por mais 4 dias a 37 °C. No fim, mede-se novamente o diâmetro do halo.

É de referir que foram analisadas 4 amostras de microcápsulas: a solução, anterior ao processo de lavagem, de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho (RED) e Branco (WHITE) e a solução, depois das lavagens, de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho (RED-L) e branco (WHITE-L). Cada amostra foi analisada em duplicado.

3.2 RESULTADOS

Neste subcapítulo discutir-se-ão os resultados obtidos, após o procedimento usado para a produção de microcápsulas de PLGA contendo Óleo de Tomilho Vermelho e Óleo de Tomilho Branco. Para os dois tipos de Óleo de Tomilho encapsulado avaliou-se a morfologia das microcápsulas, determinou-se o diâmetro médio das partículas e calculou-se a espessura da membrana. De uma forma indireta, foram obtidas também as eficiências de encapsulação do óleo. A fim de se verificar a capacidade antimicrobiana de ambos os óleos, foram elaborados os testes antimicrobianos cujos resultados serão discutidos também nesta secção.

3.2.1 Estudos de eficiência de encapsulação

Análise do tamanho de partículas e espessura da membrana

De forma a determinar o diâmetro médio das microcápsulas produzidas foi usado o equipamento *Cilas 1090 Particle Size Analyzer* que permitiu obter a distribuição de partículas em volume. A Figura 14

apresenta a distribuição do diâmetro das microcápsulas de PLGA produzidas. É possível observar uma distribuição semelhante em ambos os tipos de microcápsulas, obtendo-se valores de diâmetros médios de 44,79 μm para as microcápsulas de Óleo de Tomilho Vermelho e 48,57 μm para as microcápsulas de Óleo de Tomilho Branco.

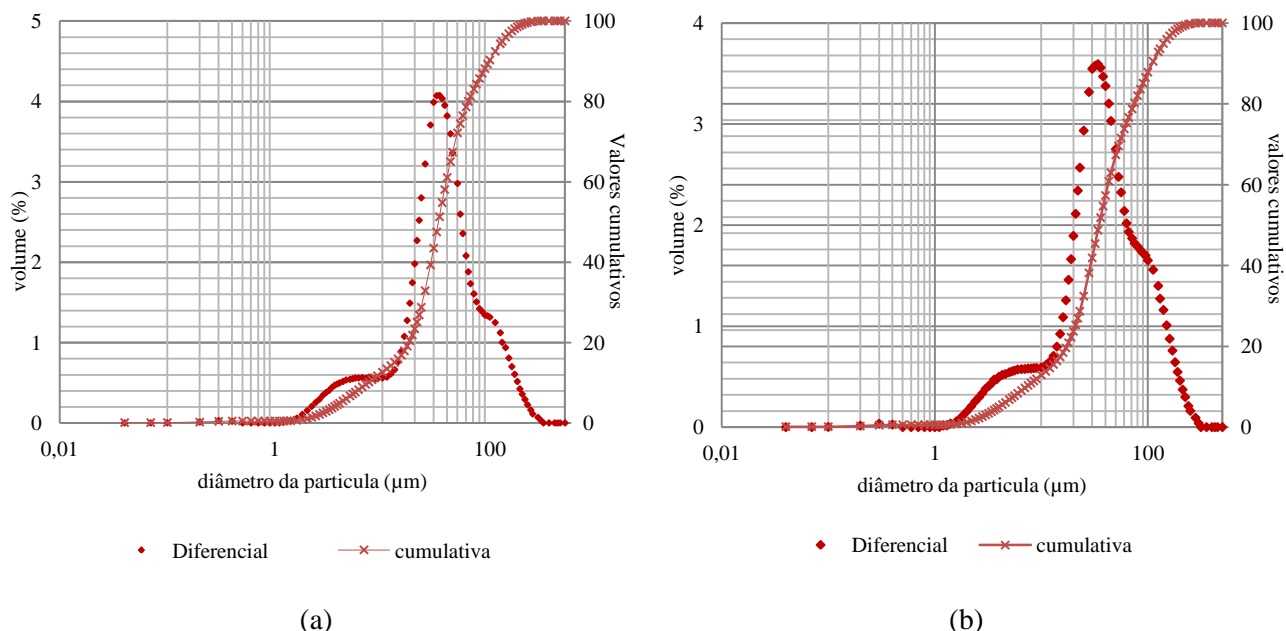


Figura 14: Distribuição do tamanho das microcápsulas de PLGA: (a) com Óleo de Tomilho Vermelho, (b) com Óleo de Tomilho Branco.

É de referir que as análises do tamanho de partículas para ambas as soluções de microcápsulas foram elaboradas sem a utilização de ultrassons, uma vez que uma análise preliminar com ultrassons às microcápsulas de Óleo de Tomilho Vermelho permitiu obter um diâmetro médio de 19,34 μm . Este valor resultou da fragmentação das microcápsulas perante a presença do ultrassons. De forma a obter-se o diâmetro real das microcápsulas procedeu-se então a análise sem ultrassons. É de referir que comparando estes valores com os obtidos por Martins (2012), que estudou a microencapsulação de Óleo de Tomilho em PLA, é possível observar que o diâmetro médio é mais elevado.

Sabendo o diâmetro médio (externo) e as restantes variáveis, pela Equação 1 (Ghosh, 2006) foi possível calcular a espessura da membrana das microcápsulas de PLGA com os dois tipos de Óleos de Tomilho (d_s).

$$d_s = (r_m - r_c) = \left[\left(\frac{w_s}{w_c} + 1 \right)^{\frac{1}{3}} - 1 \right] \times r_c \quad (1)$$

onde r_m é o raio exterior das partículas, r_c é o raio interno das partículas, w_s é a massa do material de parede e w_c é a massa do princípio ativo (óleo essencial).

Para as microcápsulas de Óleo de Tomilho Vermelho, obteve-se experimentalmente $w_s = 0,1060$ g e $w_c = 0,1833$ g. O valor de r_m , 22,40 μm , foi obtido através do valor do diâmetro médio dado pelo equipamento *Cilas1090* e r_c , 19,23 μm , foi calculado aplicando a Equação 1. Pela diferença presente na Equação 1, obteve-se uma espessura da membrana de 3,16 μm .

A mesma metodologia foi aplicada para as microcápsulas de Óleo de Tomilho Branco. Experimentalmente obtiveram-se os valores de w_s e w_c , respectivamente de 0,1267 g e 0,1836 g. O equipamento usado *Cilas 1090* permitiu obter r_m , de 24,29 μm e pela Equação 1 calculou-se r_c , de 20,39 μm . Mais uma vez, pela diferença apresentada na Equação 1, estimou-se a espessura da membrana de 3,90 μm .

Análise da morfologia das partículas

Relativamente à morfologia das microcápsulas estas foram observadas ao microscópio ótico, *Leica DM 2000*. Após o procedimento experimental e a separação de fases, foram analisadas ambas as fases, de microcápsulas e aquosa, das microcápsulas dos dois tipos de Óleos de Tomilho (Vermelho e Branco).

No que diz respeito à fase aquosa, nos dois tipos de microcápsulas, é possível observar que não há presença de microcápsulas, uma vez que o que se observa, resume-se a possíveis vestígios de óleo não encapsulado e agente endurecedor. É de referir que a observação da fase aquosa só permitiu confirmar que houve separação de fases em ambos os ensaios devido à inexistência de microcápsula nesta fase.

Na fase de microcápsulas observou-se exatamente o contrário em relação à fase aquosa. A presença de microcápsulas bem definidas confirmou a produção destas bem como a inexistência de aglomeração das partículas durante a reação.

De forma esférica invariável, as microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho apresentaram variados tamanhos, sendo que a gama compreendia valores com cerca de 8 μm (mais pequenas) até 286 μm (maiores).

Na Figura 15 é possível observar as imagens obtidas por microscopia das microcápsulas formadas e algumas das suas características, já referidas, no modo “*Brigth Field*” e “*Dark Field*”.

A fase de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco apresentou resultados semelhantes às microcápsulas de Óleo de Tomilho Vermelho: a forma esférica é dominante e não se verifica aglomeração das microcápsulas. Relativamente ao tamanho destas, estima-se que varie entre 11 μm e 170 μm .

Também estas microcápsulas foram analisadas por microscopia no modo “*Brigth Field*” e “*Dark Field*” o que mostra a Figura 16.

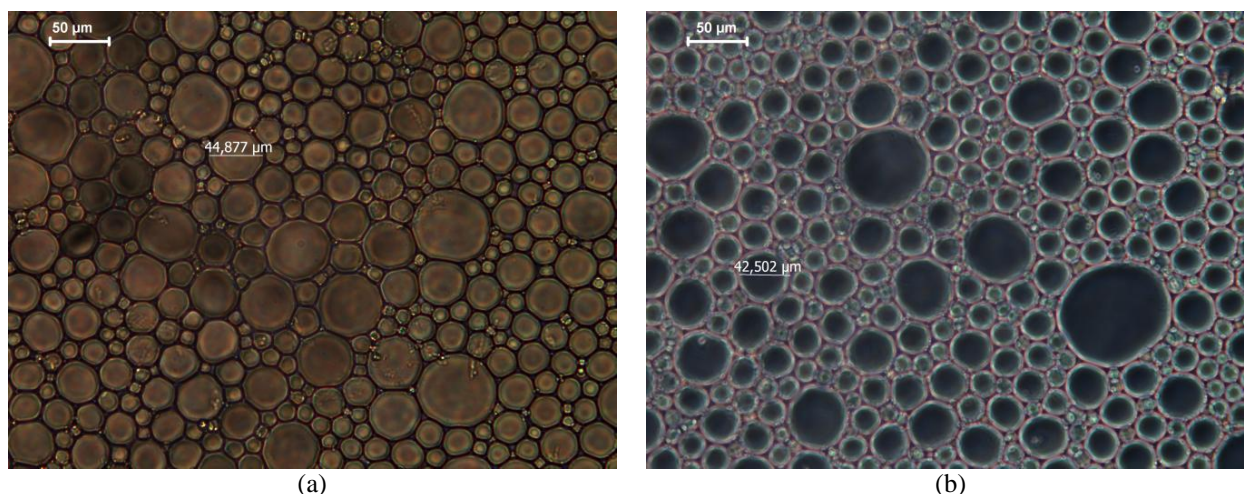


Figura 15: Imagens obtidas por microscopia ótica da solução da fase de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho, com a resolução de 200×: (a) “*Bright Field*”, (b) “*Dark Field*”.

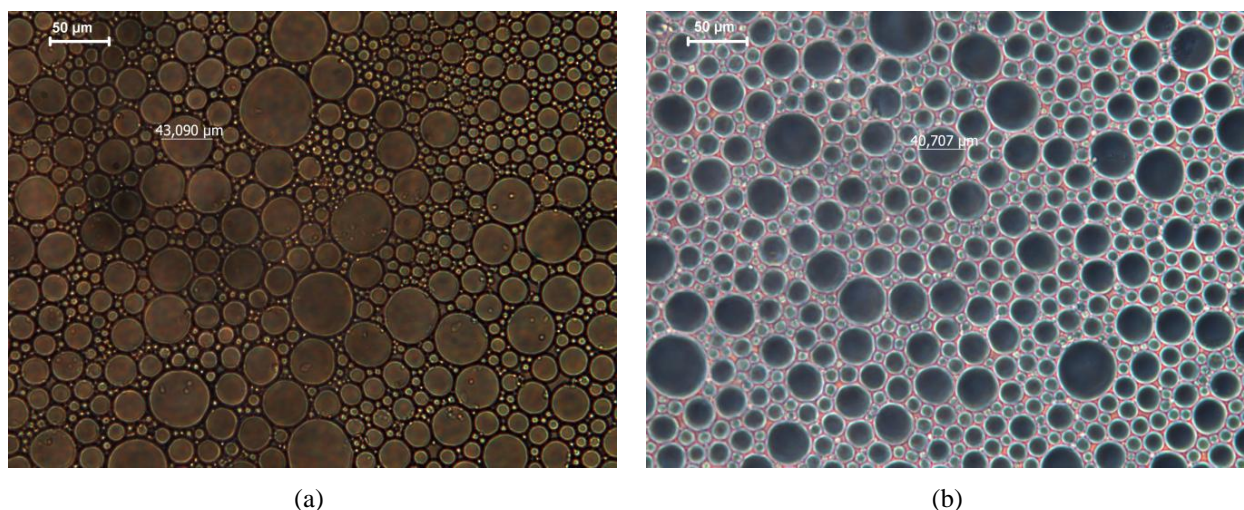


Figura 16: Imagens obtidas por microscopia ótica da solução da fase de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco, com a resolução de 200×: (a) “*Bright Field*”, (b) “*Dark Field*”.

Quantificação da encapsulação do princípio ativo

Para avaliar a encapsulação do princípio ativo, foi necessário recorrer ao equipamento de cromatografia gasosa, onde se analisaram tanto a fase aquosa como a fase de microcápsulas. Para a quantificação dos componentes foi necessário também ter em conta retas de calibração de concentrações conhecidas, de forma a ser possível relacionar as áreas dos picos dos componentes com as concentrações destes. Uma vez que foram avaliados os cinco principais componentes do Óleo de Tomilho, analisou-se por espectroscopia de massa (MS) o Óleo de Tomilho Vermelho e Branco no estado puro, cujos espectros são apresentados respetivamente na Figura 17 (a) e (b). Obteve-se assim o tempo de retenção (isto é, o tempo a que os picos surgem nos cromatogramas) e a percentagem dos componentes no óleo, ferramentas

essenciais na interpretação dos cromatogramas das fases aquosas e de microcápsulas, das soluções padrão e nos cálculos auxiliares de eficiências de encapsulação. A Tabela 6 apresenta os cinco componentes dos dois tipos de óleo que foram quantificados quanto à sua percentagem no óleo e quanto aos seus tempos de retenção.

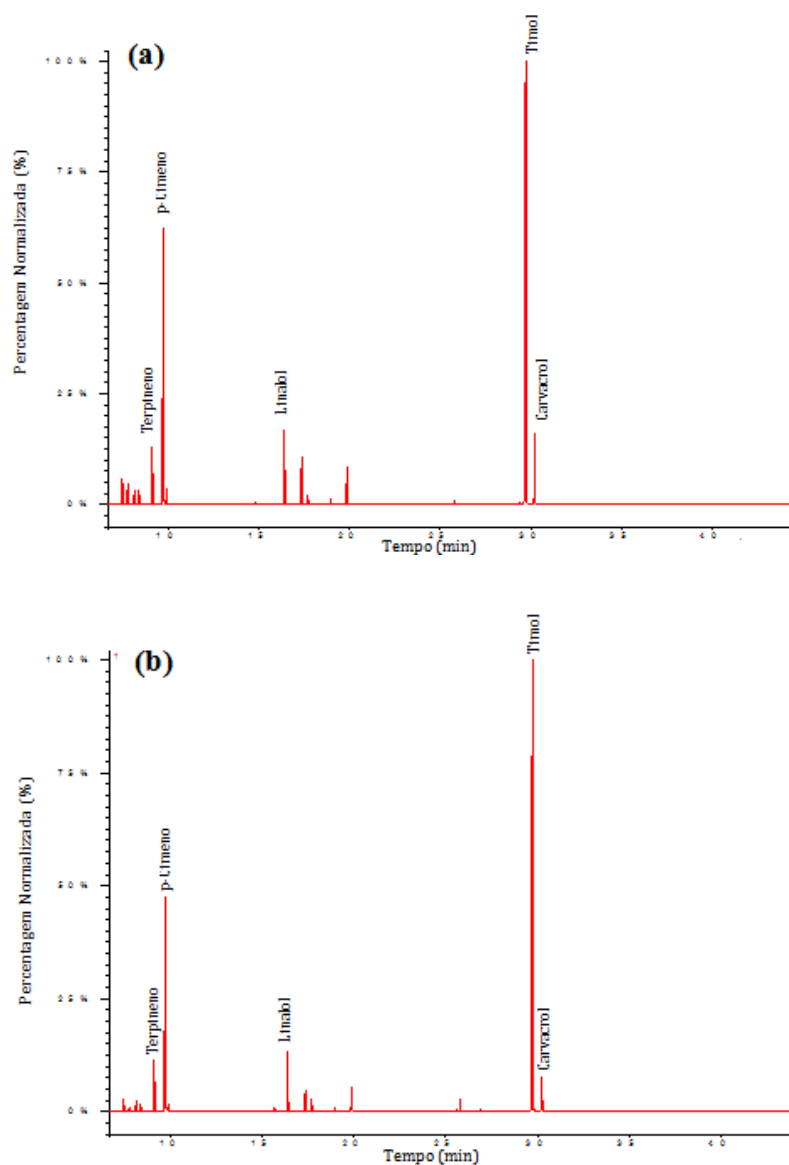


Figura 17: Espectros de massa do óleo essencial: (a) Tomilho Vermelho, (b) Tomilho Branco.

Tabela 6: Quantificação dos componentes do Óleo de Tomilho e os seus tempos de retenção.

Componente	Óleo de Tomilho Vermelho		Óleo de Tomilho Branco	
	Percentagem do componente (%)	Tempo de retenção, t_r (min)	Percentagem do componente (%)	Tempo de retenção, t_r (min)
Terpineno	6,0	9,06	6,3	9,06
p-Cimeno	29,9	9,68	26,4	9,68
Linalol	8,4	16,34	7,6	16,33
Timol	47,9	29,70	55,6	29,62
Carvacrol	7,8	30,25	4,2	30, 24

Como foi anteriormente referido e confirmado agora pelos espectros de massa, o Óleo de Tomilho apresenta maioritariamente na sua composição Timol, com cerca de 50% do óleo, sendo o p-Cimeno o segundo componente com maior percentagem. Já o Terpineno, Linalol e Carvacrol não atingem cerca de 10% da composição.

Após a análise dos óleos puros, procedeu-se à análise das fases aquosas e de microcápsulas, já separadas previamente. É de referir que após a separação de fases, em ambos os ensaios, o volume da solução de microcápsulas foi superior ao volume da solução aquosa. De cada fase aquosa e de microcápsulas foi retirada uma amostra, com volume aproximadamente de 1 mL, esta foi filtrada previamente através de filtros PTFE de 0,45 μm de diâmetro. Verificou-se que a solução de microcápsulas ofereceu maior resistência à filtração, uma vez que as microcápsulas formadas apresentam uma dimensão considerável. Tomando como exemplo o primeiro ensaio realizado, microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho, a Figura 18 mostra os dois tipos de cromatogramas referentes à fase aquosa (a) e a fase de microcápsulas (b).

A presença apenas de Timol e Carvacrol na fase aquosa, deve-se sobretudo às afinidades polares, uma vez que estes dois componentes são compostos fenólicos e polares, pelo que se justifica a não comparência dos picos relativos ao Terpineno e p-Cimeno. Devido à baixa concentração no óleo, o Linalol, apesar de ser polar, não surge na fase aquosa. Também nesta fase se verifica o pico relativo ao DMF, solvente polar usado para dissolver o PLGA na formação das microcápsulas. Na fase de microcápsulas é possível observar os picos referentes aos compostos polares (Linalol, Timol e Carvacrol), algum agente endurecedor, OCTMS e DMF de menores dimensões comparando com o pico que surge na fase aquosa. É de referir que nos cromatogramas da solução de microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Branco surgiu o pico do p-Cimeno.

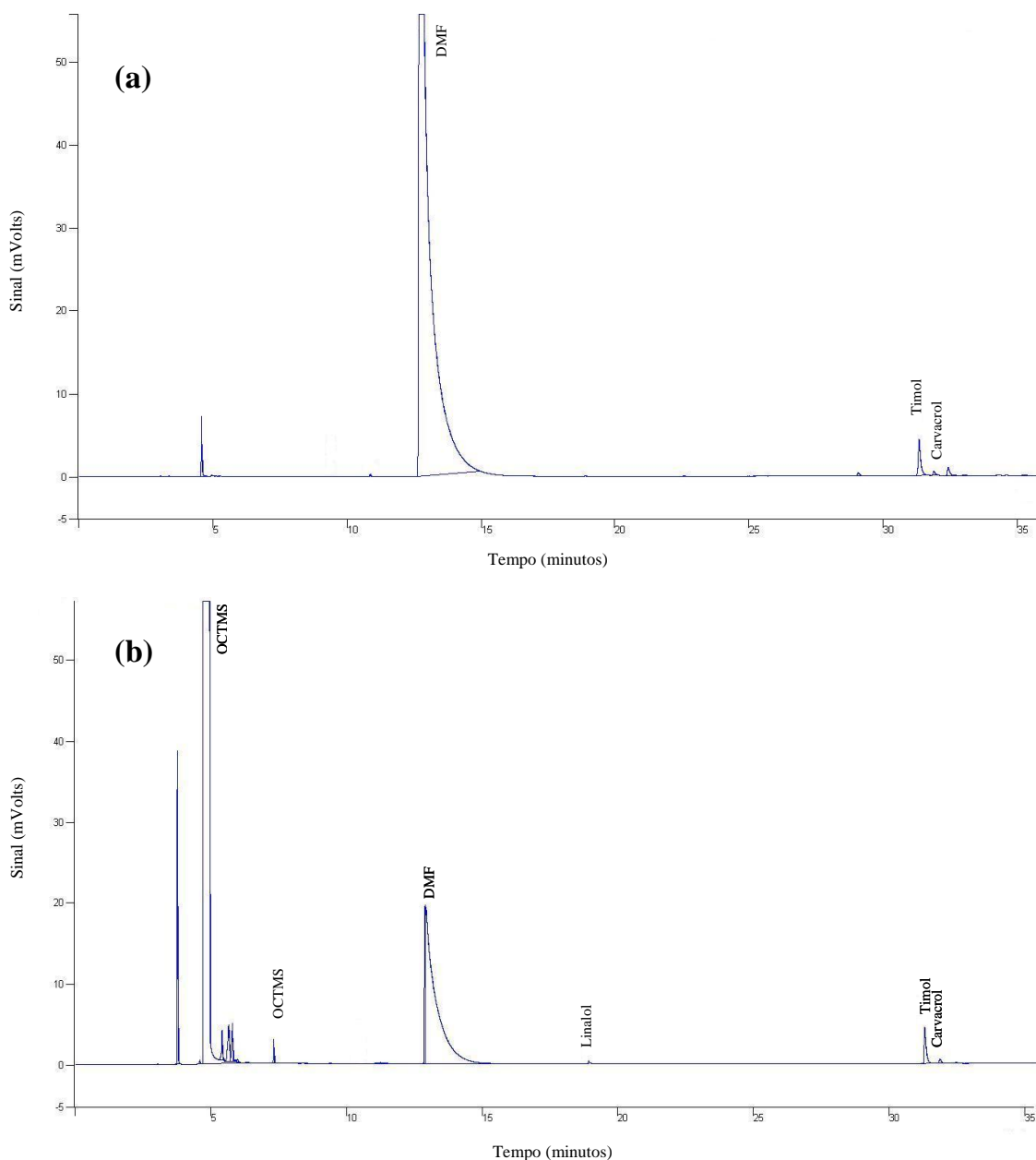


Figura 18: Cromatogramas obtidos referentes à fase aquosa (a) e fase de microcápsulas (b).

A presença dos picos nos cromatogramas corresponde aos compostos que não foram encapsulados, ou seja, a análise da fase de microcápsulas recai sobretudo na análise ao meio exterior da solução, o que se compreende devido à filtração prévia. Pode-se dizer então que a quantificação de Óleo essencial de Tomilho baseia-se num método indireto, uma vez que a massa encapsulada é obtida pela diferença da massa do componente do Óleo de Tomilho inicial ($m_{total,i}$) e a massa do componente do Óleo de Tomilho não encapsulado ($m_{não\ encapsulada,i}$), como mostra a Equação 2.

$$Eficiência\ de\ Encapsulação_i\ (\%) = \frac{m_{total,i} - m_{não\ encapsulada,i}}{m_{total,i}} \times 100 \quad (2)$$

onde i representa o componente do Óleo de Tomilho.

Assim, de forma a quantificar cada componente do Óleo de Tomilho, foram feitas e analisadas soluções padrão que permitiram traçar as curvas de calibração para cada componente (ver Anexo 1), tendo em conta as áreas dos picos em função das concentrações do respetivo componente no óleo. Com esta ferramenta, as concentrações dos componentes do óleo, os volumes obtidos em cada uma das fases e o volume inicial de óleo, através da Equação 2 obtiveram-se as eficiências de encapsulação para cada componente do Óleo de Tomilho nas microcápsulas de PLGA. Estes valores de eficiências para as microcápsulas de Óleo de Tomilho Vermelho e Óleo de Tomilho Branco, juntamente com outros dados relevantes estão presentes nas Tabelas 7 e 8 respetivamente.

Tabela 7: Eficiências de encapsulação do Óleo de Tomilho Vermelho nas microcápsulas de PLGA.

Componente	m_{total} , (g)	$m_{não\ encapsulada}$ (g)	$m_{encapsulada}$ (g)	Eficiências de Encapsulação
Terpineno	0,0110	0,0000	0,0110	100%
p-Cimeno	0,0548	0,0000	0,0548	100%
Linalol	0,0154	0,0102	0,0052	33%
Timol	0,0878	0,0390	0,0487	56%
Carvacrol	0,0143	0,0063	0,0080	56%
Apolar	0,0658	0,0000	0,0658	100%
Polar	0,1174	0,0556	0,0619	53%
Total	0,1832	0,0556	0,1276	70%

Tabela 8: Eficiências de encapsulação do Óleo de Tomilho Branco nas microcápsulas de PLGA.

Componentes	m_{total} , (g)	$m_{não\ encapsulada}$ (g)	$m_{encapsulada}$ (g)	Eficiência de Encapsulação
Terpineno	0,0116	0,0000	0,0115	100%
p-Cimeno	0,0485	0,0157	0,0328	68%
Linalol	0,0140	0,0082	0,0057	41%
Timol	0,1019	0,0510	0,0509	50%
Carvacrol	0,0077	0,0045	0,0032	41%
Apolar	0,0600	0,0157	0,0443	74%
Polar	0,1236	0,0638	0,0598	48%
Total	0,1836	0,0795	0,1041	57%

Relativamente às eficiências de encapsulação do Óleo de Tomilho Vermelho, é de realçar que houve uma encapsulação preferencial pelos compostos apolares (Terpineno e p-Cimeno) o que se verifica pela eficiência de 100%. Comparando com a percentagem de encapsulação de compostos apolares, de 82%, obtidos por Martins et al. (2011) que estudou a encapsulação do mesmo tipo de Óleo de Tomilho (Vermelho) em microcápsulas de PLA, é possível verificar que há maior eficiência de encapsulação dos compostos apolares nas microcápsulas de PLGA.

Já as eficiências dos compostos polares (Linalol, Timol e Carvacrol) encontram-se na mesma gama de valores obtidos por Martins et al. (2011), 54%, sendo que a eficiência de encapsulação destes compostos nas microcápsulas de PLGA é de 53%.

No que diz respeito à eficiência global, concluiu-se que a microencapsulação do Óleo de Tomilho em PLGA é mais eficiente comparativamente à do óleo em PLA confrontando os 70% com os cerca de 65% (Martins et al., 2011). Esta eficiência global mais elevada deve-se claramente aos compostos apolares devido às suas eficiências mais significativas. O tipo de agente tensioativo usado poderá ter influenciado a eficiência de encapsulação global. É de referir que os agentes tensioativos são caracterizados através do seu Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB), isto é a sua tendência hidrofílica ou lipofílica. O agente tensioativo usado, Tergitol, apresenta um HLB médio de 13,3, pelo que é o ideal para emulsões óleo-em-água (Heusch & AG, 2005). Outros fatores que também influenciam a eficiência global são, segundo Johansen et al. (1998), as interações polares entre o PLGA e o princípio ativo, neste caso o Óleo de Tomilho (através da sua parte hidrofílica). Assim são estabelecidas ligações através de pontes de hidrogénio que permitem uma maior estabilidade entre o polímero e o óleo (Jyothi et al., 2010).

Quanto à encapsulação do Óleo de Tomilho Branco, verificaram-se que as eficiências no geral são inferiores comparando com os valores obtidos da encapsulação do Óleo de Tomilho Vermelho. Enquanto os compostos polares em ambos os ensaios apresentam uma eficiência relativamente próxima (53% e 48%), os compostos apolares já apresentam eficiências mais discrepantes (100% e 74%). Essas eficiências podem ser justificadas, uma vez que para o Óleo de Tomilho Vermelho se assume total encapsulação dos compostos apolares enquanto para o Óleo de Tomilho Branco se assume 100% apenas para o Terpineno, pois uma parte de p-Cimeno surge como não encapsulado. Estas discrepâncias de valores refletem-se assim na eficiência global, levando a que a eficiência de encapsulação do Óleo de Tomilho Branco seja mais baixa, de 57%, relativamente à encapsulação de Óleo de Tomilho Vermelho, de 70%. Outro fator que certamente poderá ter influenciado as percentagens de encapsulação do Óleo de Tomilho Branco foi a percentagem de cada componente no óleo, uma vez que as áreas dos picos dos componentes se mantiveram dentro da mesma gama para ambos os ensaios.

De forma a averiguar a viabilidade de encapsulação no PLGA e a verificar se as eficiências de encapsulação obtidas estão dentro da gama aceitável é possível comparar as eficiências de encapsulação globais dos dois ensaios com outros estudos de microencapsulação de compostos hidrofílicos em PLGA.

Corrigan & Li (2009) estudaram a encapsulação de Indometacina em PLGA (50:50) e concluíram que a sua eficiência de encapsulação rondava os 65%. Nos estudos de Blanco-Príeto et al. (2004) sobre encapsulação de Somatostatina em PLGA (50:50) foi possível obter eficiências de 75% e 66% nos dois ensaios realizados. Já Pool et al. (2012) averiguou a encapsulação de Quercetina e Catequina em PLGA, obtendo eficiências de encapsulação de 79% e 76% respetivamente.

Estes estudos permitem verificar a existência de uma gama de valores semelhantes. Confrontando as eficiências de encapsulação em PLGA do Óleo de Tomilho Vermelho e Branco, 70% e 57% respetivamente, pode-se concluir que estas são coerentes com os valores já referenciados. No entanto é

necessário ter em conta que os valores de eficiências dependem do quão hidrofílico é o composto encapsulado, pois esse fator terá influência na ligações entre o composto encapsulado e o agente encapsulante, neste caso o PLGA.

3.2.2 Estudo da capacidade antimicrobiana

Como foi anteriormente referido, o teste antimicrobiano foi realizado com o objetivo de averiguar a capacidade antimicrobiana das microcápsulas de PLGA, mais especificamente do seu princípio ativo, o Óleo de Tomilho, que tem na sua composição Timol e Carvacrol, compostos com características antimicrobianas (Jouki et al., 2014).

Inicialmente foram avaliadas as amostras RED e WHITE. O procedimento de preparação e inoculação das placas de petri e de introdução das microcápsulas está descrito no início deste capítulo. Tomando como exemplo as amostras RED e WHITE, a Figura 19 mostra o aspeto geral inicial das placas de petri com as amostras de microcápsulas. É de referir que estas imagens são coerentes para todos os ensaios e respetivos duplicados.

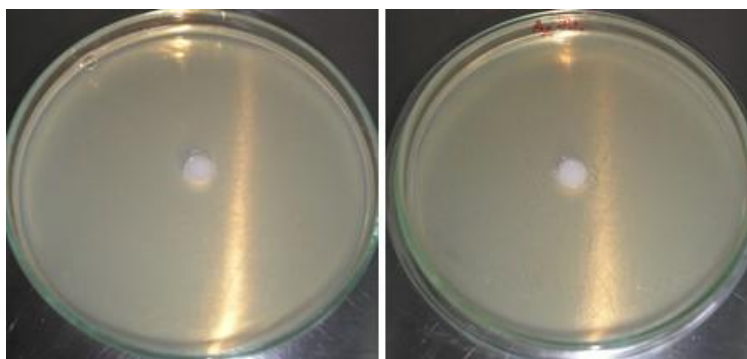


Figura 19: Placas de Petri após inoculação e introdução das amostras RED2 e WHITE2 respetivamente.

Uma vez que após 24 horas se verificou o halo de inibição, procedeu-se ao passo seguinte: a incubação das amostras durante 4 dias a 37 °C. Os valores obtidos dos diâmetros do halo de inibição, D_{hi} estão presentes na Tabela 9. É de referir que as amostras foram testadas em duplicado.

Tabela 9: Diâmetro do halo de inibição após 24 horas e 4 dias para as amostras e respetivos duplicados.

Amostra	D_{hi} após 24 horas (cm)	D_{hi} após 4 dias (cm)
RED1	3,5	3,5
RED2	3,5	3,5
WHITE1	3,5	3,5
WHITE2	3,5	3,5

Através da Tabela 9 é possível observar que ambas as amostras apresentaram atividades antimicrobianas semelhantes. O diâmetro do halo de inibição após 24 horas de incubação foi coerente,

não havendo qualquer tipo de oscilação para com o duplicado. No entanto verificou-se que após um período de incubação de 4 dias não houve qualquer alteração no diâmetro, permitindo concluir que não houve uma difusão tão significativa do princípio ativo após as 24 horas.

A fim de se verificar a presença/ausência de difusão do princípio ativo após o primeiro tempo de incubação, optou-se pela repetição dos testes, mas agora com as amostras RED-L e WHITE-L, sendo que a única diferença destas amostras para as anteriores recaía no processo de lavagem por que estas sofreram. Assim, procedeu-se de forma semelhante aos testes anteriores e mediram-se os diâmetros do halo de inibição das amostras e duplicados. Os resultados obtidos estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10: Diâmetro do halo de inibição após 24 horas e 4 dias para as amostras e respectivos duplicados.

Amostra	D_{hi} após 24 horas (cm)	D_{hi} após 4 dias (cm)
RED-L1	3,0	3,5
RED-L2	3,0	3,5
WHITE-L1	2,5	3,0
WHITE-L2	3,0	3,5

Os valores presentes na Tabela 10 indicam que, em ambas as amostras, a atividade antimicrobiana aumentou, pois o diâmetro do halo de inibição aumentou também. Verifica-se também que as amostras RED são concordantes entre duplicados, havendo apenas uma oscilação de 0,5 cm de diâmetro após incubação de 4 dias, o que é aceitável pois indica o aumento do halo de inibição. Já nas amostras WHITE, verifica-se uma oscilação de 0,5 cm entre duplicados após 24 horas, no entanto é possível observar que após o período de 4 dias ambos apresentam um aumento concordante, de 0,5 cm.

Comparando os valores das Tabelas 9 e 10 pode-se concluir que a difusão do princípio ativo encapsulado em PLGA para o agar é mais prolongada nas amostras que foram previamente submetidas ao processo de lavagem, uma vez que este permitiu a eliminação dos compostos não encapsulados e a estabilização da solução de microcápsulas. É de referir que a eliminação dos compostos não encapsulados permitiu que a difusão observada fosse inteiramente do princípio ativo encapsulado.

De forma a permitir uma breve verificação da coerência dos valores obtidos nos testes antimicrobianos ao Óleo de Tomilho, comparam-se estes com a literatura já existente. Emiroğlu et al. (2010) estudou a capacidade antimicrobiana do Óleo de Tomilho (incorporado num filme de soja comestível) perante a bactéria Gram Negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Após uma incubação de 24 horas, a uma temperatura de 37 °C observou que os diâmetros do halo de inibição rondavam os 4 cm. Verificou-se assim que os resultados obtidos eram aceitáveis, pois não eram muito discrepantes dos já referenciados.

É de notar que a escolha da bactéria para a realização dos testes incidiu nas do tipo Gram Negativa, pois comparativamente as bactérias Gram Positiva, estas são mais complexas e apresentam uma maior resistência aos agentes antimicrobianos devido à ‘barreira restrita’ criada pela membrana exterior

(Emiroğlu et al., 2010). No entanto, verificou-se que o Óleo de Tomilho era capaz de inibir o crescimento da bactéria, através dos seus componentes fenólicos Carvacrol e Timol. A ação antimicrobiana destes compostos é explicada por Burt (2004) afirmando que o Carvacrol e o Timol têm a capacidade de desintegrar o lado exterior da membrana da Bactéria Gram Negativa, provocando a libertação dos lipopolissacarídeos da membrana e permitindo a permeabilidade ao ATP (adenosina trifosfato) da membrana citoplasmática.

4 Conclusões

A produção de microcápsulas revestidas com um polímero biodegradável, PLGA, contendo Óleo de Tomilho, foi conseguida através de um método novo de coacervação, já testado, sendo possível a formação de microcápsulas com os dois tipos de Óleo de Tomilho usados.

Quer as microcápsulas de Óleo de Tomilho Vermelho, quer as de Óleo de Tomilho Branco apresentaram, através da microscopia ótica, uma forma regular e esférica, bem definidas e de diversas dimensões.

Através da análise do tamanho de partículas foi possível obter o diâmetro médio de 44,79 μm para as microcápsulas de PLGA com Óleo de Tomilho Vermelho e de 48,57 μm para as de Óleo de Tomilho Branco. Estes valores permitiram obter uma estimativa da espessura da membrana, de cerca de 3,16 e 3,90 μm respetivamente.

As eficiências de encapsulação foram obtidas através de um balanço à massa de óleo resultando assim numa eficiência global de 70% e 57% respetivamente para o Óleo de Tomilho Vermelho e Branco. Estes valores foram fortemente influenciados devido à preferencial encapsulação dos compostos apolares. Estes valores de eficiências poderão ser influenciados pelo agente tensoativo usado, o polímero e as interações polares óleo-polímero.

A realização dos testes antimicrobianos de forma qualitativa, permitiu verificar a capacidade de inibição por parte do Óleo de Tomilho, devido à presença dos compostos Timol e Carvacrol. Verificou-se que, para as amostras de microcápsulas que sofreram previamente o processo de lavagem, a sua difusão tornou-se mais prolongada, uma vez que se verificou o crescimento do halo de inibição passados 4 dias.

Apesar de não ter sido estudado a taxa de difusão do princípio ativo, os testes antimicrobianos confirmaram a difusão deste, devido à presença do halo de inibição após um período de 24 horas e 4 dias.

4.1 OBJETIVOS REALIZADOS

Após a realização deste trabalho, vários foram os objetivos conseguidos. A produção de microcápsulas de PLGA com dois tipos de Óleo de Tomilho foi realizada com sucesso uma vez que se verificou a viabilidade da microencapsulação. Essa viabilidade centrou-se essencialmente na caracterização por microscopia eletrónica de forma a avaliar a morfologia das microcápsulas obtidas, na análise do tamanho de partículas que posteriormente permitiu o cálculo da espessura da membrana e, por fim, na quantificação de óleo encapsulado através da cromatografia gasosa, permitindo a obtenção das eficiências de encapsulação dos componentes principais do óleo bem como as eficiências de encapsulação globais. Além destes objetivos atingidos, também a capacidade antimicrobiana do Óleo de Tomilho encapsulado em PLGA foi estudada, conseguindo-se resultados positivos.

4.2 LIMITAÇÕES E TRABALHO FUTURO

Excluindo a maioria dos objetivos deste trabalho, que foram realizados, apenas os estudos de difusão do princípio ativo ficaram por concluir. Estes ainda foram iniciados, no entanto o curto período de tempo restante e a indisponibilidade do equipamento impossibilitaram a análise da difusão e consequentemente a sua discussão e conclusão.

No entanto, os estudos de difusão poderão ser alvo de trabalho futuro, uma vez que com os estudos antimicrobianos provou-se a existência de difusão do princípio ativo, podendo os resultados ser comparados com a literatura atual. Um outro trabalho futuro recai na otimização do processo de microencapsulação de Óleo de Tomilho em PLGA, averiguando qual o PLGA com a melhor razão de ácido láctico e ácido glicólico e estudar o agente tensioativo utilizado que permite obter maiores eficiências de encapsulação. Outro estudo que se poderá ter em conta recai na substituição do princípio ativo, ou na alteração do polímero biodegradável, como por exemplo o uso do PGA.

4.3 APRECIÇÃO FINAL

A minha apreciação final do trabalho desenvolvido é positiva. De uma forma geral, grande parte dos objetivos estipulados inicialmente foram atingidos com sucesso, no que se traduziu em resultados coerentes e apresentáveis. Penso que a falta de tempo limitou o encontro de algumas respostas para alguns problemas que possam ter surgido, uma vez que era necessário um período experimental ainda considerável e por consequência equipamento disponível. No entanto, perante os resultados obtidos, a avaliação dos cerca de cinco meses de trabalho é claramente positiva.

Referências

- Almeida, A. P. Rodríguez-Rojo, S. Serra, A. T.... Duarte, C. M. M. (2013). Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 140–145.
- Altana. (2014). Altana. Acedido em 26 de maio de 2014, disponível em <http://www.altana.com/>
- Badi, H. N. Yazdani, D. Ali, S. M. & Nazari, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 19, 231–236.
- Bansode, S. S. Banarjee, D. D. S. L., J. & Thorat, R. M. (2010). Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*, 1, 38–43.
- Blanco-Prieto, M. J. Campanero, M. A. Besseghir, K.... Gander, B. (2004). Importance of single or blended polymer types for controlled in vitro release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 96, 437–448.
- Brasileiro, J. S. L. (2011). *Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas*, Universidade Fernando Pessoa, 14-24.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94, 223–253.
- Carvalho, R. (2011). *Supercritical Fluid Aided Microencapsulation of Dry Powders*, University of South Florida, 48.
- Charlé, R. Zviak, C. & Kalopissis, G. (1976). Cosmetic composition containing microcapsulated solvents for nail enamel, United States Patent (3978294).
- Cheng, S. Y. Yuen, C. W. M. Kan, C. W. & Cheuk, K. K. L. (2008). Development of Cosmetic Textiles Using Microencapsulation Technology. *Research Journal of Textile and Apparel*, 12, 41–51.
- Choi, D. H. Park, C. H. Kim, I. H.... Han, D. K. (2010). Fabrication of core-shell microcapsules using PLGA and alginate for dual growth factor delivery system. *Journal of Controlled Release*, 147, 193–201.
- Cilas. (2014). Cilas. Acedido em 17 de abril de 2014, disponível em http://www.particle-size.com/cilas_1090_particle.htm
- Corrigan, O. I. & Li, X. (2009). Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *European journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 477–485.
- Della Porta, G. Castaldo, F. Scognamiglio, M.... Reverchon, E. (2012). Bacteria microencapsulation in PLGA microdevices by supercritical emulsion extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 1–7.
- Dima, C. Cotârlet, M. Alexe, P. & Dima, S. (2014). Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 203–211.

- Dubey, R.Shami, T. . C.& Rao, K. U. B. (2009). Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal*, 59, 82–95.
- Emiroğlu, Z. K.Yemiş, G. P.Coşkun, B. K.& Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat science*, 86, 283–288.
- Encapsys. (2013). Encapsys Microencapsulation. Acedido em 16 de março de 2014, disponível em <http://www.encapsys.com/coreMaterials.aspx>
- Fairhurst, D. & Loxley, A. (n.d.). Micro- and Nano- encapsulation of Water- and Oil-soluble Actives for Cosmetic and Pharmaceutical Applications. Em *Cosmetic Delivery Systems* (p. 24).
- Frascareli, E. C.Silva, V. M.Tonon, R. V.& Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 413–424.
- Gavahian, M.Farahnaky, A.Javidnia, K.& Majzoobi, M. (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 85–91.
- Ghosh, S. K. (2006). Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. *Functional Coating*, 14.
- Gi, C. B. & Jun, K. B. (2000). Skin protective cosmetic base composition containing stabilized vitamin C and phytosphingosine United States Patent.
- Heusch, R. & AG, B. (2005). Emulsions. Em *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistr*, 29.
- Hiwtc. (2014). HIWTC. Acedido em 16 de março de 2014, disponível em <http://www.hiwtc.com/products/carbon-paper-796-1652.htm>
- Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21, 2475–2490.
- Johansen, P.Men, Y.Audran, R.... Gander, B. (1998). Improving Stability and Release Kinetics of Microencapsulated Tetanu Toxoid by Co-Encapsulation of Additives. *Pharmaceutical Research*, 15, 1103–1110.
- Jouki, M.Mortazavi, S. A.Yazdi, F. T.& Koochehi, A. (2014). Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 99, 537–546.
- Jyothi, N. V. N.Prasanna, P. M.Sakarkar, S. N.... Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, 27, 187–97.
- Krzysik, D. G. (1999). Soft tissue achieved by applying a solid hidrophilic lotion, United States Patent (5869075).
- Kumar, K. P. S.Sk, T.Banu, S.... Bhowmik, D. (2013). Microencapsulation technology. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1, 324–328.
- Kvitnitsky, E.Paluy, I.Oleinik, I.... Yasman, Y. (2011). Compositions for topical application comprising microencapsulated colorants, United States Patent (US2011/0229536).

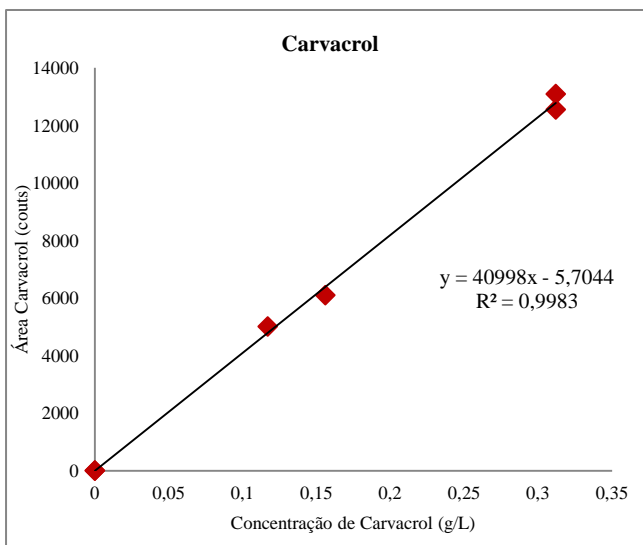
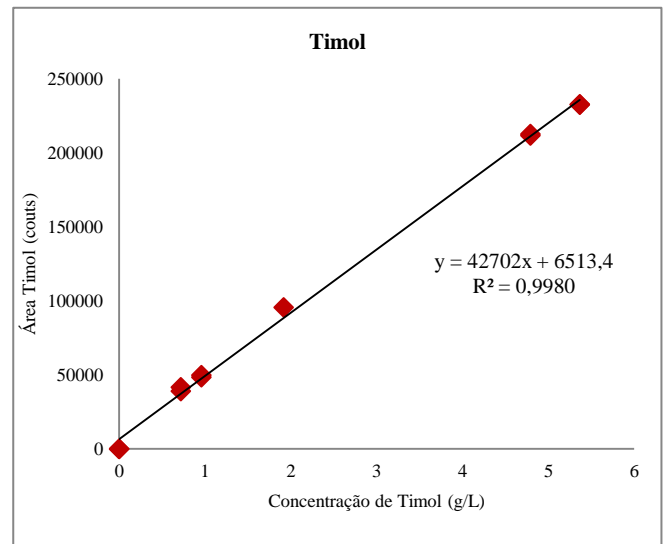
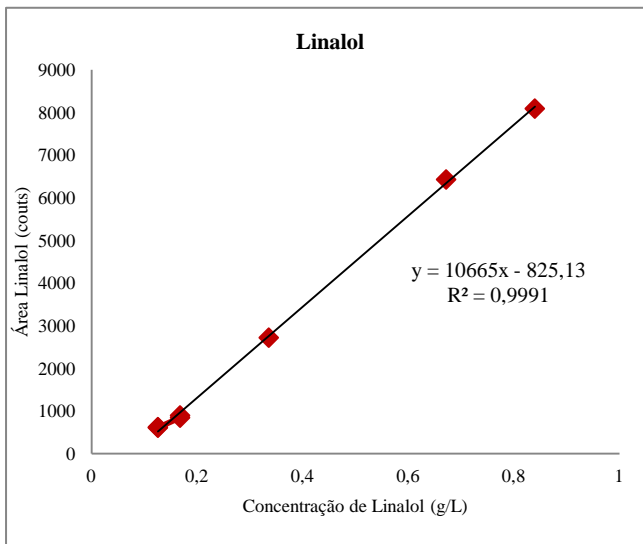
- Lewis, D. (1990). Controlled release of bioactive agents from lact ide/glycolide polymers. Em *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, 1–41.
- LipoTechnologies. (2014). Lipo Technologies. Acedido em 26 de maio de 2014, disponível em <http://www.lipotechnologies.com/cosmetics-personal-care/>
- Makadia, H. K. & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3, 1377–1397.
- Martins, I. M.Barreiro, M. F.Coelho, M.& Rodrigues, A. E. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191–200.
- Martins, I. M. D. (2012). *Microencapsulation of Thyme Oil by Coacervation: Production, Characterization and Release Evaluation*, FEUP, 4-90.
- Martins, I. M.Rodrigues, S. N.Barreiro, M. F.& Rodrigues, A. E. (2011). Release of Thyme Oil from Polylactide Microcapsules. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 13752–13761.
- Melgarejo-Flores, B. G.Ortega-Ramírez, L. a.Silva-Espinoza, B. a.... Ayala-Zavala, J. F. (2013). Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 321–328.
- Nelson, G. (2002). Application of microencapsulation in textiles. *International journal of pharmaceutics*, 242, 55–62.
- Ocak, B. (2012). Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. *Journal of Environmental Management*, 100, 22–28.
- Optic, B. (2014). Bio Optic. Acedido em 17 de abril de 2014, disponível em http://www.bio-optic.com/prod_clinica_rutina_investigacion.html
- Orlandi. (2014). Orlandi. Acedido em 26 de maio de 2014, disponível em <http://orlandi-usa.com/>
- Perrier, E. (2012). Encapsulation in cosmetics or not, that is the question! *Bioencapsulation Innovations*, 1–24.
- Pirbalouti, A. G.Hashemi, M.& Ghahfarokhi, F. T. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 48, 43–48.
- Pool, H.Quintanar, D.Figueroa, J. D. D.... Mendoza, S. (2012). Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1–12.
- Raileanu, M.Todan, L.Voicescu, M.... Maganu, M. (2013). A way for improving the stability of the essential oils in an environmental friendly formulation. *Materials Science and Engineering C*, 33, 3281–3288.
- Rathore, S.Desai, P. M.Liew, C. V.... Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116, 369–381.
- Robert-Blondel. (2014). Robert Blondel Cosmétiques. Acedido em 26 de maio de 2014, disponível em <http://www.robert-blondel.fr/>

- Rodrigues, S. N. Martins, I. M. Fernandes, I. P.... Rodrigues, A. E. (2009). Scentfashion®: Microencapsulated perfumes for textile application. *Chemical Engineering Journal*, 149, 463–472.
- S, J. S. Seethadevi, A. Prabha, K. S.... Pavitira, P. (2012). Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3, 509–531.
- Scopus. (2014). Scopus. Acedido em 18 de fevereiro de 2014, disponível em <http://www.scopus.com/>
- Severino, P. Santana, M. H. A. Pinho, S. C. & Souto, E. B. (2011). Polímeros Sintéticos Biodegradáveis: Matérias-primas e Métodos de Produção de Micropartículas para uso em Drug Delivery e Liberação Controlada. *Polímeros*, 21, 286–292.
- Simmonet, J. T., Biatry, B., Prigent, F. (2009). Core/skin type capsules and preparation method, EP2011565.
- Solomon, B. Sahle, F. F. Gebre-Mariam, T.... Neubert, R. H. H. (2012). Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, 61–66.
- Sootitawat, A. Takayama, K. Okamura, K.... Linko, P. (2005). Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 163–170.
- Tanner A., Kathleen, Dubois, Zerlina, Guzdar. (1995). Cosmetic cleansing composition with dual blooming perfume system, Wipo Patent Application, WO/1995/ 016432.
- Trino, A. S. M. (2012). *Estudo sistemático da formação de estrutura em processos de microencapsulação por evaporação de solvente*, Universidade de Coimbra, 6-13.
- Umer, H. Nigam, H. Tamboli, A. M. & Nainar, M. S. M. (2011). Microencapsulation: Process, Techniques and Applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2, 474–481.
- Utad. (2014). Utad Jardim Botânico. Acedido em 20 de março de 2014, disponível em http://jb.utad.pt/especie/thymus_vulgaris
- Walentowska, J. & Foksowicz-Flaczyk, J. (2013). Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84, 407–411.
- Wu, X. (1995a). Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Em *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, 1015-1054.
- Wu, X. (1995b). Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Em *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, 1151-1200.
- Wu, X. S. (2004). Synthesis, Characterization, Biodegradation and Drug Delivery Application of Biodegradable Lactic/ Glycolic Acid Polymers: Part III. Drug Delivery Application. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 32, 575–591.

Zhanel, G. G. Hoban, D. J. Schurek, K. & Karlowsky, J. A. (2004). Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*, 24, 529–535.

Anexo 1 Retas de Calibração

- Retas de Calibração para o Óleo de Tomilho Vermelho



- Retas de Calibração para o Óleo de Tomilho Branco

